ORSAY
N° d'ordre : 1410

THÈSE

PRESENTEE

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

PAR

MONTIES Bernard

Sujet : **Etude de quelques relations entre polyphénols et photosynthèse : présence, compartimentation et métabolisme des polyphénols dans les chloroplastes.**

Soutenue le 5 Mars 1975 **devant la Commission d'examen**

MM. MOYSE — **Président.**

CHOPIN
COSTES
GUERN
MARTIN
} **Examinateurs.**

ORSAY
N° d'ordre : 1410

THÈSE

PRESENTEE

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

PAR

MONTIES Bernard

Sujet : **Etude de quelques relations entre polyphénols et photosynthèse : présence, compartimentation et métabolisme des polyphénols dans les chloroplastes.**

Soutenue le 5 Mars 1975 devant la Commission d'examen

MM. MOYSE — **Président.**

CHOPIN
COSTES
GUERN
MARTIN
} **Examinateurs.**

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

à

ma femme et mes enfants

et

mes parents et beaux parents

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie biologique et de Photophysiologie (INRA) de l'Institut National Agronomique et je tiens à remercier la Direction Générale de l'Institut National de la Recherche Agronomique de m'avoir donné les moyens de réaliser ces recherches dans de bonnes conditions humaines et matérielles .

Mr le Professeur MOYSE a bien voulu me faire profiter de ses conseils et de ses critiques minutieuses . Je le remercie de son attention bienveillante et de l'honneur qu'il me fait de présider le Jury de cette Thèse .

Je remercie le Professeur GUERN d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail et de m'en avoir donné une critique approfondie .

Mr le Professeur CHOPIN , président du Groupe Polyphénols , m'a fait profiter de ses connaissances très précieuses dans le domaine de la Chimie Structurale des flavones . C'est dans son Laboratoire , grâce à lui et à Mlle BOUILLANT , que fut réalisée l'identification par spectrométrie de masse des mélosides . Il a accepté de faire partie de ce Jury et je lui en exprime ma profonde gratitude .

Je remercie Mr MARTIN , Chef du Département de Physiologie végétale de l'INRA de m'avoir conseillé et d'avoir accepté de faire partie de ce Jury .

Que Mr COSTES , Directeur du Laboratoire de Chimie biologique et de Photophysiologie trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance . Il m'a vivement incité à entreprendre ce travail , il l'a suivi , il m'a fait part de ses critiques et il m'a permis libéralement de mener à bien ce long travail . Je le remercie très profondément pour la confiance amicale qu'il m'a témoignée .

Je tiens à remercier aussi particulièrement Mr JOUIN pour l'assistance technique , dévouée et dynamique qu'il m'a apportée depuis 1971 dans la réalisation de ce travail . Enfin j'exprime mes remerciements à tous les membres du Laboratoire auprès desquels j'ai pu trouver de l'aide dans des conditions toujours sympathiques et spécialement à Mme LAURENCE qui a assuré la dactylographie de ce travail .

Trois saints , également jaloux de leur salut ,
Portés d'un même esprit , tendaient à même but ,
Ils s'y prirent tous trois par des routes diverses .

LA FONTAINE , Livre XII , fable XXV :
" Le juge arbitre , l'hospitalier et le solitaire "

P L A N

	Pages
INTRODUCTION ET APERCU HISTORIQUE	1
I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	4
I-1 - Structure et propriétés physicochimiques des acides cinnamiques et des flavonoïdes	4
I-1-1 - Propriétés spectroscopiques	4
I-1-2 - Propriétés oxydoréductrices au sens large	5
I-2 - Localisation et compartimentation des polyphénols	6
I-2-1 - Localisation dans les tissus foliaires , effet sur le rendement de la photosynthèse dans le proche ultraviolet	6
I-2-2 - Localisation dans les chloroplastes	7
I-2-3 - Localisation subcellulaire et compartimentation des polyphénols	8
I-3 - Métabolisme des polyphénols par les chloroplastes	12
I-3-1 - Biosynthèse de polyphénols par les chloroplastes	12
I-3-2 - Phénylalanineammonialyase chloroplastique	13
I-3-3 - Phénolase chloroplastique	15
I-4 - Polyphénols et activité photosynthétique	20
I-4-1 - Activité DPO de la phénolase et photosynthèse	20
I-4-2 - Polyphénols et accepteur primaire du photosystème I	21
I-4-3 - Polyphénols et absorption transitoire des chloroplastes dans le proche UV	22
I-4-4 - Polyphénols et photophosphorylations photosynthétiques	22
I-4-5 - Polyphénols et couplage des photophosphorylations	23
I-4-6 - Régulation d'enzymes par les polyphénols	25
II - METHODES D'ANALYSE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES	28
II-1 - Plantes étudiées et conditions de culture	28
II-2 - Préparation des échantillons	28
II-2-1 - Préparation des échantillons de feuilles lyophilisées	28
II-2-2 - Préparation des chloroplastes	29
II-2-3 - Préparation de poudres acétoniques	29
II-3 - Extraction des polyphénols	30
II-3-1 - Extraction préparative (extracteur de Soxhlet)	30
II-3-2 - Extraction progressive discontinue	31

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544701_0028

II-3-3 - Extraction analytique par gradient 31
II-3-4 - Reconstitution des échantillons et extraction progressive des polyphénols 32
II-3-5 - Extraction de flavones de référence (Lutéoline, apigénine, acacétine) 33
II-4 - Purification des polyphénols 33
II-4-1 - Séparation préparative par chromatographie sur papier 33
II-4-2 - Séparation préparative sur couche de cellulose 34
II-4-3 - Chromatographie analytique des polyphénols 35
II-4-4 - Electrophorèse analytique des polyphénols 36
II-5 - Caractérisation des polyphénols 37
II-5-1 - Caractérisation sur couches minces 37
II-5-1-1 - Révélation par le réactif de GIBBS 37
II-5-1-2 - Révélation par le réactif de NEU 38
II-5-2 - Caractérisation par spectroscopie dans l'ultraviolet 38
II-5-3 - Caractérisation par spectroscopie dans l'infrarouge 39
II-5-4 - Hydrolyses 40
II-5-4-1 - Hydrolyse acide 40
II-5-4-2 - Hydrolyse alcaline 40
II-5-4-3 - Hydrolyse enzymatique 40
II-5-4-4 - Identification des sucres libérés par hydrolyse 41
II-6 - Dosage des polyphénols 42
II-6-1 - Dosage spectrophotométrique en solution 42
II-6-2 - Dosage réflectométrique sur couche mince 43
II-7 - Etude des activités enzymatiques 43
II-7-1 - Purification des surnageants par filtration sur gel 44
II-7-2 - Mesure de l'activité PAL 44
II-7-2-1 - Dosage spectrophotométrique de la PAL 44
II-7-2-2 - Dosage réflectométrique de la PAL 45
II-7-3 - Recherche de l'activité MPO 45
II-7-4 - Recherche d'enzyme catabolisant les flavonols 46
III - RESULTATS ET DISCUSSION 47
III-A-1 - Contrôle des produits et méthodes de référence 47
III-A-2 - Identification des flavonosides du Melon (mélosides) 49
III-A-2-1 - Standard spectral des mélosides A et L 50
III-A-2-2 - Comparaison chromatographique des mélosides 50
III-A-2-3 - Hydrolyse acide des mélosides, structure de A et L 51
III-A-2-4 - Hydrolyse alcaline et enzymatique des mélosides 52
III-A-2-5 - Structure du méloside 1 53

III-B - Localisation et compartimentation dans les feuilles et chloroplastes 56

III-B-1 - Présence de polyphénols dans les chloroplastes d'Angiospermes 56

III-B-1-1 - Préparations chloroplastiques de Tomate 56

III-B-1-2 - Préparations chloroplastiques de Melon 59

III-B-1-3 - Préparations chloroplastiques de quelques autres Angiospermes 63

III-B-2 - Compartimentation dans les feuilles et les préparations de chloroplastes 66

III-B-2-1 - Compartimentation dans les feuilles de Melon (mise en évidence , effet du mode d'extraction , effet de la séquence des solvants , effets du pH et de complexants , relation avec les constituants insolubles des feuilles) 66

III-B-2-2 - Compartimentation dans les préparations de chloroplastes de Melon (mise en évidence , analyse quantitative dans les chloroplastes et les feuilles , relation avec les constituants insolubles des chloroplastes) 74

III-B-2-3 - Compartimentation dans les feuilles et les préparations de chloroplastes de Tomate (mise en évidence , analyse quantitative , relation avec les constituants insolubles des chloroplastes) 77

III-B-2-4 - Compartimentation chez d'autres végétaux 78

III-C - Métabolisme des polyphénols par les chloroplastes 79

III-C-1 - Activités enzymatiques dans les feuilles et les chloroplastes 80

III-C-1-1 - Cas de la phénylalanineammonialyase (PAL) 80

III-C-1-2 - Cas des activités MPO et DPO de la phénolase 81

III-C-1-3 - Cas de la flavonolase (FOA) 81

III-C-2 - Présence d'activité PAL dans les chloroplastes 82

III-C-3 - Présence d'activité MPO dans les chloroplastes 83

IV - DISCUSSION GENERALE , CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 85

IV-1 - Structure des mélosides 85

IV-2 - Présence de polyphénols dans les chloroplastes : artéfact d'adsorption ou effet du métabolisme ? 87

IV-3 - Métabolisme des polyphénols dans les chloroplastes 88

IV-4 - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles et les chloroplastes 89

IV-5 - Quelques relations entre polyphénols et photosynthèse . 91

IV-5-1 - Absorption dans le proche ultraviolet 91

IV-5-2 - Photooxydation sensibilisée des ortho-diphénols . 92

Abréviations

- ADP = Adénosine Dinucléotide Phosphate .
- ATP = Adénosine Trinucléotide Phosphate .
- $A(O)_2$ = Quinone correspondant au diphénol $A(OH)_2$.
- $A(OH)_2$ = Diphénol (ou "hydroquinone") correspondant à $A(O)_2$.
- CoA = Coenzyme A .
- CRS = Cytochrome reducing substance (FUJITA et MYERS , 1971) .
- DCMU = Dichlorophényldiméthylurée .
- FOA = Activité flavonolase .
- f Aq = Forme Aq : ensemble des polyphénols solubilisés par l'eau (Aq) lors de la mise en évidence de leur compartimentation (p.11) par extraction progressive .
- f Me = Forme Me = homologue de la forme Aq solubilisée par le méthanol (Me) .
- FRS = Ferredoxine reducing substance (YOCUM et SAN PIETRO , 1970) .
- HE (réaction) = réactions dites " haute énergie " .
- MPO = Activité monophénoloxydase de la phénolase (* : p.15) .
- NAD(P) = NicotinamideAdénineDinucléotide (Phosphate) .
- NAD(P)H = NAD(P) réduit .
- PAL = Phénylalanineammonialyase
- PO = Phénolase (* : p.15)
- Structure des aglycones flavoniques (figure 9) .

INTRODUCTION ET APERÇU HISTORIQUE

Les composés polyphénoliques qui ont été décrits dans les végétaux peuvent à la fois être très semblables par leur type, c'est à dire l'arrangement spatial de leur squelette carboné (tableaux 1) et très différents par le détail du mode de substitution de ce squelette. La combinaison de ces deux facteurs explique la diversité, quelque peu déconcertante, et le nombre élevé des composés polyphénoliques ; c'est ainsi qu'en 1972, HARBORNE rapportait l'existence de près de 600 composés polyphénoliques du seul type flavonoïde.

Les composés polyphénoliques les plus fréquents dans les feuilles des végétaux supérieurs sont du type flavone et acide cinnamique (BATE-SMITH, 1956, 1962) . En fait la production de flavonoïdes semble être " étroitement et universellement " associée au phénomène de lignification (HARBORNE, 1972) et, il en est évidemment de même, pour les composés de type acide cinnamique qui sont les précurseurs biosynthétiques des lignines.

Il n'est donc pas surprenant que cette conjonction entre diversité et ubiquité ait stimulé les recherches des chimistes, puis des physiologistes. En fait, ce n'est que vers le début de ce siècle que furent caractérisés les composés polyphénoliques les plus simples et les moins fragiles ; mais il convient de remarquer, que certains d'entre eux furent étudiés bien avant en raison de leur intérêt technologique. C'est ainsi que SEGUIN (1797) utilisa magistralement pour le tannage des peaux les découvertes faites par SCHEELE (1787) sur l'acide gallique et que CHEVREUL (1832) isola des flavones à propriétés tinctoriales et fit de celles-ci " les matières colorantes jaunes les plus utilisées jusqu'au début de ce siècle " (THOMAS, 1906).

C'est donc vers le début de ce siècle, et parce que la structure de plusieurs composés polyphénoliques avait été établie, souvent avec difficultés *, que débutèrent valablement les premières recherches de physiologie végétale concernant les composés polyphénoliques. Dès cette époque, trois hypothèses fondamentales concernant le rôle de ces substances étaient opposées : celle du rôle protecteur contre les parasites, celle de substances de réserves que la plante peut métaboliser à certains moments et celle des substances de déchet que la plante met à l'écart du métabolisme.

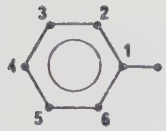
---

* Les descriptions données successivement dans les 3 parties du Dictionnaire de Chimie de WURTZ (1908) de composés polyphénoliques, tels les acides caféique, chlorogénique, ou la lutéoline et la quercétine par exemple, permettent d'apprécier très précisement ces difficultés rencontrées et surmontées.

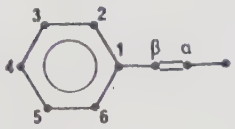
Tableau 1A- PRINCIPAUX TYPES DE POLYPHENOLS VEGETAUX

(Les atomes de carbone sont figurés par des points , on a seulement représenté l'hétérocycle distinctif des divers flavoïdes).

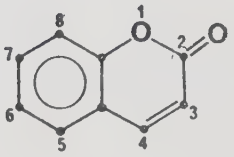
BENZOÏQUE C_6 C_1



CINNAMIQUE C_6 C_3



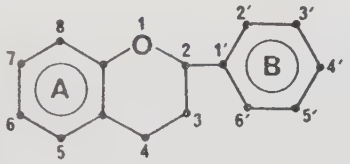
coumarine



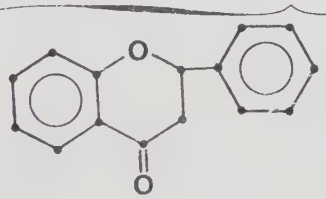
LIGNINE $(C_6\ C_3)\ n$

lignane $(C_6\ C_3)_2$

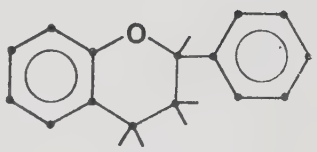
FLAVONOÏDES C_6 C_3 C_6 sensu lato (flavoïdes)



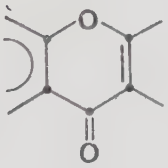
Flavonoïdes sensu stricto



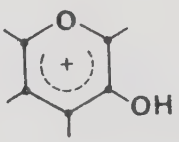
Flavanoïdes



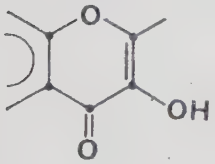
flavone



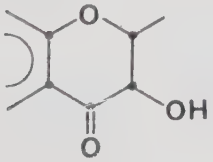
anthocyane



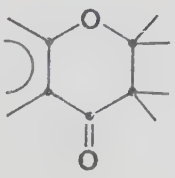
flavonol

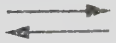


flavanonol

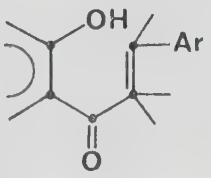


flavanone





chalcone



STILBENE $(C_1\text{-}C_6\text{-}C_2\text{-}C_6)$

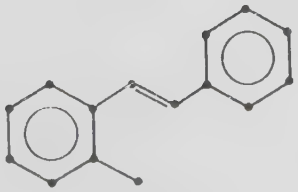
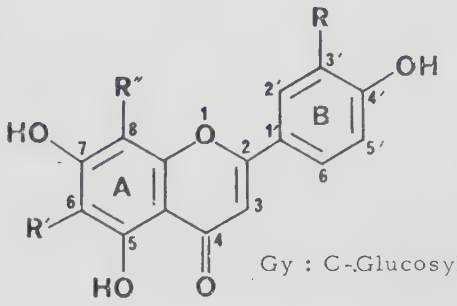


Tableau 1B - STRUCTURE DES FLAVONES ET DES DERIVES DES ACIDES CINNAMIQUES

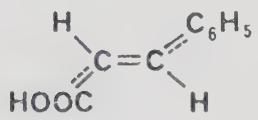
R	R'	R''		
H	H	H	Apigenine	(Ap)
H	Gy	H	Isovitexine	(It)
H	H	Gy	Vitexine	(Vi)
OH	H	H	Luteoline	(Lu)
OH	Gy	H	Isoorientine	(Io)
OH	H	Gy	Orientine	(Or)

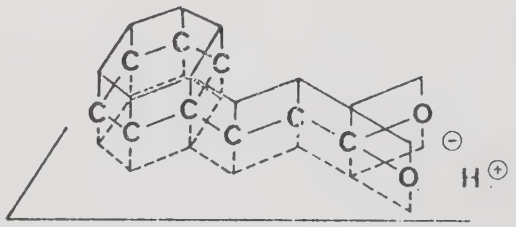


Gy : C-Glucosyl

Flavones et C-glucosylflavones

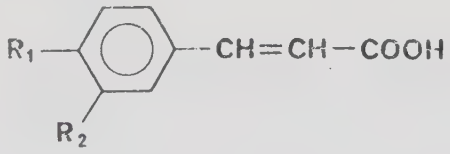
1. Acide cinnamique





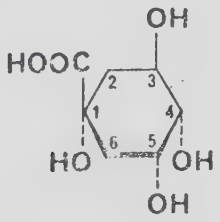
2. Acides hydroxycinnamiques

R_1 = OH	R_2 = H	p-coumarique
R_1 = OH	R_2 = OH	caféique

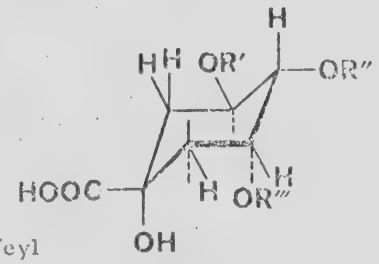


3. Acides chlorogéniques

Acide quinique



Acides chlorogéniques	R'	R''	R'''
ac. chlorogénique	Ca	H	H
band 510	H	Ca	H
ac. néochlorogénique	H	H	Ca



Ca = cafeyl

Acides cinnamiques

C'est GORIS (1914) qui, après une remarquable analyse systématique de la localisation des composés polyphénoliques dans les végétaux, imposa la dernière des trois hypothèses. Il convient de remarquer que GORIS, dès 1914, admettait la possibilité d'une utilisation "secondaire" des composés phénoliques.

Ce n'est pourtant que plusieurs dizaines d'années plus tard que l'on put mettre sérieusement en doute ce caractère de déchet et affirmer que ces substances ne sont pas nécessairement maintenues à l'écart du métabolisme (COMBES, 1930 - MAC KINNEY, 1940 - WATTIEZ et STERNON, 1942). Dès cette époque la participation active des composés polyphénoliques, ou tout au moins de certains d'entre eux, au métabolisme des végétaux était admise ; la question de leur rôle était donc posée à nouveau.

Actuellement, et comme l'écrivait déja SESHADRI en 1951, "il peut paraître incroyable que les pigments polyphénoliques n'aient pas une grande signification physiologique chez les végétaux mais il n'en demeure pas moins que, exception faite pour la lignine, aucune théorie proposée concernant leur fonction n'a de valeur générale". Il est très révélateur de constater, à ce propos, que HARBORNE, l'un des meilleurs spécialiste actuel, des composés phénoliques insistait, déjà en 1964, sur " l'activité des composés phénoliques dans le métabolisme des plantes" et sur le fait que " ce ne sont en aucune façon des produits inertes du métabolisme" mais reconnaissait encore en 1972 " que le rôle des flavonïdes dans les feuilles, par exemple, restait obscur et qu'aucune fonction principale ne pouvait leur être attribuée".

C'est dans ce contexte d'incertitude que nous avons tenté d'apporter une contribution à l'étude physiologique des composés polyphénoliques des feuilles des végétaux supérieurs. Compte-tenu de leur ubiquité nous nous sommes limités aux seuls dérivés de type cinnamique et flavone , et, dans ce cadre, nous avons recherché une éventuelle relation entre activités photosynthétiques et composés polyphénoliques.

Il nous a paru raisonnable de rechercher une telle relation parce que tous les composés polyphénoliques, du fait de la structure électronique de la fonction phénol qui leur est commune et malgré leurs différences de détail, sont des pigments capables d'une part d'absorber le rayonnement ultraviolet (effet de pigment) et d'autre part d'interagir avec les chaînes d'oxydo-réduction (effet électronique).

Il nous a semblé inutile, tout au moins au début d'une telle recherche, d'étudier systématiquement les effets directs (en tant que système électroniquement actif) ou indirects (en tant que pigment) des composés

polyphénoliques sur les activités photosynthétiques . En effet , compte-tenu de la grande réactivité de ces substances , il paraissait presque invraisemblable que ces composés ne puissent pas in vitro interférer par exemple avec les chaînes photosynthétiques de transfert d'électron .

Au contraire , nous avons essayé de préciser les facteurs et phénomènes qui pouraient in vivo déterminer la possibilité de tels effets . C'est la raison pour laquelle nous avons , d'autre part , recherché , la présence dans les chloroplastes de composés phénoliques et d'enzymes capables de les métaboliser et , d'autre part , tenté de mettre en évidence une éventuelle compartimentation de ces substances par extraction progressive au moyen de solvants .

Après un bref rappel concernant les propriétés physicochimiques nous ferons un bilan des principaux résultats qui mettent en relation les composés polyphénoliques , les chloroplastes et leur activité photosynthétique . Dans une seconde partie nous présenterons les méthodes d'analyse utilisées . Enfin , la troisième partie consacrée à l'exposé critique des résultats sera suivie des conclusions générales .

I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Nous avons présenté , sur le tableau 1B , la structure des principaux acides cinnamiques et flavones cités par la suite . Pour éviter toute ambiguité de nomenclature nous avons utilisé le terme flavonoïde (tableau 1A) au sens strict (MONTIES , 1966 a) et éliminé les termes mal définis tels que flavenols , flavenoïdes et flavinoïdes qui ont été utilisés (YOCUM et SAN PIETRO , 1970 - GEE et al. , 1970) pour décrire parfois " des polyphénols " recherchés dans les chloroplastes .

I - 1 - Structure et propriétés physicochimiques des acides cinnamiques et flavonoïdes .

De nombreuses revues bibliographiques ont été consacrées aux acides cinnamiques (STEVENS et NORD , 1955 - GEISSMAN , 1958 - SONDHEIMER , 1958 - HARBORNE , 1964 - RIBEREAU-GAYON , 1968) et aux flavonoïdes (GRIPENBERG , 1962 - HATTORI , 1962 - SHIMOKORIYAMA , 1962 - CHOPIN , 1966 - ALSTON , 1968 - HARBORNE , 1972 - PARIS , 1973) . Parmi les propriétés physicochimiques de ces polyphénols , nous n'envisageons ici que leurs propriétés de pigments absorbant l'ultraviolet et leurs propriétés de systèmes oxydoréducteurs au sens large . Ces deux propriétés ne sont d'ailleurs pas indépendantes , elles dépendent toutes deux du fait qu'il existe sur l'ensemble de ces deux types de molécules un système de doubles liaisons conjuguées . Dans les acides cinnamiques , la conjugaison entre le carboxyle et le cycle benzènique résulte de l'existence de la double liaison α , β (tableau 1B) . Dans les flavonoïdes , la conjugaison entre les cycles A et B résulte de la présence de la double liaison 2 , 3 . Nous avons discuté par ailleurs certaines conséquences du phénomène de conjugaison : planéité des molécules et existence d'isomères cis-trans (MONTIES , 1966 a , b) et effets spectroscopiques dans le cas des flavones (MONTIES et DOUILLARD , 1969) .

I - 1 - 1 - Propriétés spectroscopiques .

On constate , lorsque l'on compare l'absorption des polyphénols dans le domaine du proche ultraviolet solaire entre 290 et 400 nm (JAGGER , 1973) que , de façon générale , l'extension du système conjugué , la présence de substituants et l'ionisation des substituants ont pour effet de déplacer les maximums d'absorption vers les grandes longueurs d'onde et en augmentant en général , les coefficients d'absorption . Nous avons illustré ces effets , ici , dans le cas des flavonoïdes , des acides cinnamiques , des acides aminés aromatiques et dérivés benzèniques homologues (tableau 2) . Il convient de souligner que , seule , l'introduction de substituants capables

Tableau 2 - ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET (250 - 400 nm) DE MONOPHENOLS, D'ORTHODIPHENOLS ET DES COMPOSES AROMATIQUES HOMOLOGUES.
(λ: longueur d'onde du maximum principal, ε : coefficient molaire).

Composés	(solvant)	λ	(ε)	Référence
Benzène	(hexane)	254	(204)	SCOTT (1964)
Phénol	(eau)	270	(1450)	-
o-diphénol	(eau, pH 3)	275,5	(2300)	-
Phénylalanine	(soude 0,1 N)	256	(200)	RAUEN (1964)
Tyrosine	(HCl 0,1 N)	278	(1500)	-
Dihydrophényl-alanine	(HCl 0,01 N)	280	(6100)	-
Ac. cinnamique	(eau)			
- trans		273	(21.000)	SCOTT (1964
- cis		264	(9.500)	-
Ac. p-coumarique	(éthanol)			
- trans		312	(21.700)	KARNT (1966)
- cis		307	(12.000)	-
Ac. caféique	(éthanol)			
-trans		328	(16.600)	-
- cis		320	(8.400)	-
3¦5,7-hydroxyflavone (éthanol)		336	(21.000)	JURD (1956)
Apigénine		269	(20.400)	-
3¦4¦5,7-hydroxyflavone (éthanol)		350	(14.800)	-
Lutéoline		255	(13.500)	-
3,3¦5,7-hydroxyflavone (éthanol)		367,5	(21.900)	-
Kaempférol		266	(16.600)	-
3,3¦4¦5,7-hydroxyflavone (éthanol)		373	(21.900)	-
Quercétine		257	(20.400)	-

de se conjuguer avec le système de doubles liaisons affecte les propriétés de pigments des polyphénols. Ainsi la formation de O-glycosides, de C-glycosides (figure 1B) ou d'esters de molécules aliphatiques ne modifie pratiquement par ces paramètres d'absorption. Par contre, toute modification du systhème de doubles liaisons conjuguées, et même, une simple isomérisation cis-trans (tableau 2) suffisent pour modifier considérablement ces propriétés spectroscopiques. Les acides cinnamiques et flavones constituent donc, malgré leur diversité de détails, un groupe très homogène de pigments absorbant dans tout le domaine de l'ultraviolet solaire et cela d'autant mieux que leur squelette carboné est plus conjugué.

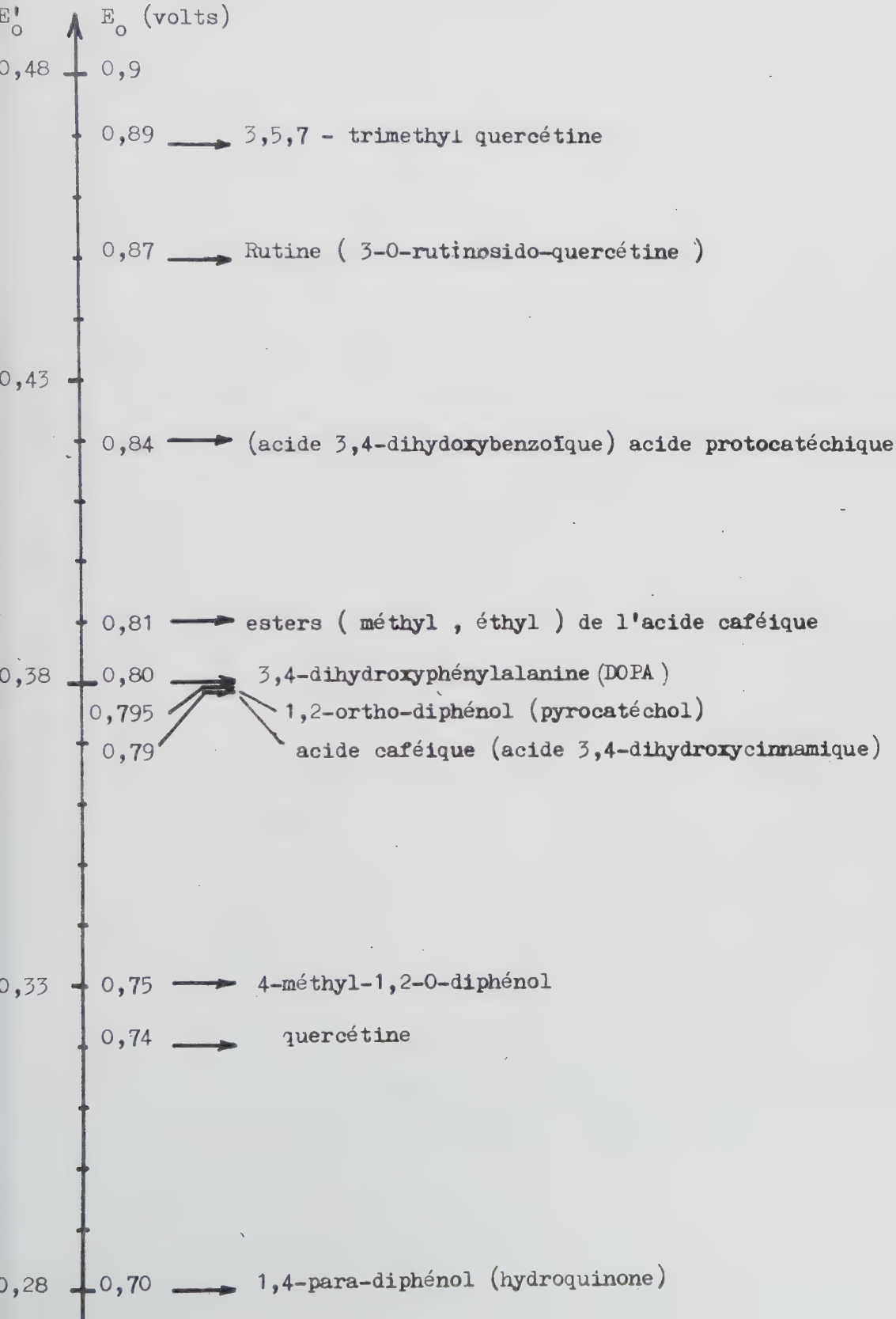
I - 1 - 2 - Propriétés oxydo-réductrices au sens large.

Contrairement aux propriétés spectroscopiques, les propriétés oxydo-réductrices des polyphénols ont fait l'objet de très peu d'études systématiques. Nous avons regroupé dans le tableau 3 les valeurs des potentiels d'oxy-réduction des principaux ortho-diphénols homologues déja comparés (tableau 2). On peut vérifier, encore une fois, que le potentiel d'oxydo-réduction des systèmes "ortho-diphénols - ortho-quinones" dépend de la nature des substituants (MONTIES, 1966 b). Il convient cependant d'insister sur le fait que ces valeurs ont été obtenues lors de mesures en solution pure : elles ne peuvent donc être extrapolées sans précaution à d'autres milieux ; en particulier à des phases hétérogènes telles que des membranes biologiques, puisque nous avons vérifié que, même en solution, les réactions d'oxydo-réduction dépendent de la nature des tampons (MONTIES, 1967). Quoiqu'il en soit, ces données permettent déja de supposer que les polyphénols de type ortho-diphénol, ainsi que les ortho-quinones correspondantes qui résultent de leur oxydation, sont capables de réagir dans les chaînes photosynthétiques de transfert d'électron à des niveaux de potentiel normal (pH 7,0) de l'ordre de + 0,3 à + 0;5 volt. Il convient cependant d'ajouter que les autres polyphénols qui ne possèdent pas de fonctions ortho-diphénols comme l'acide p-coumarique et le kaempférol ne peuvent former de quinone, et donc, des systèmes oxydo-réducteurs comparables aux précédents ; cependant, ils sont a priori susceptibles d'interagir aussi avec les chaînes de transfert d'électron, par exemple en perdant un ou deux électrons (GEISSMAN, 1958), par un mécanisme, mettant en jeu la conjugaison de l'ensemble de la molécule, du type antioxygène (DUFRAISSE, 1936 - MATHIEU et PANICO, 1972). En conséquence on peut conclure que les polyphénols sont non seulement des pigments mais des pigments électroniquement actifs, capables de piéger irreversiblement des électrons ou de les échanger réversiblement en formant des couples oxydo-réducteurs.

Avant de discuter les modalités même de ces interactions nous ferons maintenant le point des problèmes que pose la localisation des composés

Tableau 3 - Potentiel standard , à pH = 0 , E_o de quelques diphénols .

Ces valeurs ont été calculées d'après les résultats de HORNER et GEYER (1965) MONTIES (1967) LOTH et al. (1972) obtenus dans des milieux différents . La variation $\frac{\Delta E}{\Delta pH}$ vaut - 60 mV/unité pH , le potentiel standard à pH 7,0 (E'_o) calculé pour ces systèmes est donné par E'_o (volt) = E_o - 0,42 .



polyphénoliques dans les feuilles et en particulier dans les chloroplastes .

I - 2 - Localisation et compartimentation des polyphénols .

Nous envisagerons successivement leur localisation dans les différents tissus foliaires , puis dans les chloroplastes et enfin les problèmes généraux dépendant de leur compartimentation .

I - 2 - 1 - Localisation dans les tissus foliaires , effet sur le rendement de la photosynthèse dans le proche ultraviolet .

La localisation des composés polyphénoliques a beaucoup été étudiée . C'est certainement GORIS qui , en 1914 , montra le premier que , de façon générale, les composés polyphénoliques ne sont pas uniformément répartis dans les différents organes des plantes . Depuis ces résultats ont été toujours confirmés ; il semble même possible d'affirmer que les différents tissus d'un même organe se distinguent , en général , non seulement par la nature mais aussi par le métabolisme des polyphénols qu'ils contiennent et l'on peut trouver une belle illustration dans les résultats récents de SHEEN (1973) concernant la fleur et la capsule du Tabac (Nicotiana Tabacum L.) ou ceux de WARDALE (1973) sur le fruit de Tomate (Lycopersicum esculentum Mill. . Des résultats analogues ont été rapportés dans les feuilles et , en premier , par GORIS évidemment , qui , dès 1914, a pu mettre en évidence l'accumulation sélective des polyphénols dans les divers tissus des feuilles : épiderme , parenchymes , asises sous-épidermiques . Par la suite , ces recherches histochimiques ont été poursuivies et d'après les travaux de TRONCHET (1968 , 1971 a et b) , TISSUT (1969) et de DELAVEAU et al.(1972), il semble que les flavonoïdes soient principalement localisés dans les épidermes des feuilles alors que les acides cinnamiques paraissent plus largement répandus dans l'ensemble du limbe . Ces résultats nous ont paru d'autant plus importants à considérer , lors d'une analyse des effets des polyphénols sur la photosynthèse , que les pigments polyphénoliques absorbent le rayonnement ultraviolet . Nous avons donc supposé que dans la mesure où les polyphénols ne réemettent pas la lumière ultraviolette absorbée , ces pigments pouvaient constituer un écran absorbant vis à vis des parenchymes assimilateurs de la feuille et donc qu'ils pouvaient contribuer , entre autre effet , à abaisser le rendement quantique de la photosynthèse dans le proche ultraviolet . Au moment où nous avons entrepris ce travail , quelques rares publications paraissaient confirmer cette hypothèse et permettaient de supposer que le rendement de la photosynthèse , tant in vitro sur chloroplastes d'Epinard (BLACK et al. , 1962) qu'in vivo

chez certaines Algues (HALLDAL , 1967) , diminuait rapidement au delà de 350 nm à cause de l'absorption , due à des pigments non photosynthétiques . C'est la raison pour laquelle nous avons comparé , dans ce travail , l'absorption relative dans le proche ultraviolet des pigments foliaires et chloroplastiques (MONTIES , 1971 , 1972 c) . C'est à cette même époque que furent publiés par Mc CREE les premières observations systématiques concernant le rendement de la photosynthèse , dans le proche ultraviolet , de plantes cultivées .

Mc CREE a mis en évidence , sur 22 plantes cultivées , une chute de ce rendement entre 300 et 400 nm qu'il a attribué à la présence dans les feuilles de " matériel non photosynthétique " qui n'a pas été identifié (Mc CREE , 1971 , 1972) . Par la suite , il a précisé que cette chute de rendement peut être attribuée à la localisation dans l'épiderme de certaines feuilles de ce " matériel non photosynthétique " (Mc CREE et DICKENSHEET , 1972 - Mc CREE , 1973) . Les polyphénols étant responsables de la majeure partie de l'absorption des feuilles dans le proche ultraviolet , il nous semble actuellement (MONTIES , 1972 c) que ces pigments constituent la plus grande partie de ce " matériel non photosynthétique " . Ainsi , ce premier ensemble de résultats paraît bien confirmer l'existence d'un effet indirect (effet de pigment ou d'écran) des composés polyphénoliques sur l'activité photosynthétique . Quand à la seconde hypothèse , concernant l'effet direct (effet électronique) des polyphénols sur les chaînes photosynthétiques de transfert d'électron , nous avons déja vu qu'elle sous-entendait la présence de polyphénols dans les chloroplastes . Nous examinerons donc maintenant le second problème de localisation posé , cette fois , au niveau des chloroplastes ..

I - 2 - 2 - Localisation dans les chloroplastes .

C'est en 1962 , que KROGMAN et STILLER ont rapporté brièvement , et pour la première fois , la présence de flavonoïdes dans les chloroplastes (vraisemblablement d'Epinard) . Par la suite HATTORI et SATO (1963) , puis KEFELI et TURETSKAYA (1966) , ZAPROMETOV et KOLONKOVA (1967) rapportèrent respectivement la présence d'acide chlorogénique dans les chloroplastes de Saxifrage (Saxifraga stolonifera Meerb.) , de flavonoïdes et de flavanoïdes dans ceux de Saule (Salix purpurea L.) et de Théier (Thea sinensis L.) . Il convient de souligner , à ce propos , que ARNON (1949) découvrant en 1949 l'activité oxydasique des chloroplastes d'Epinard vis à vis des substrats polyphénoliques de type ortho-diphénol , remarquait que les " chloroplastes contiennent naturellement de tels substrats " ; compte-tenu des résultats précédents , il fournissait ainsi le premier indice con-

cernant la présence de polyphénols dans les chloroplastes . Ce sont là , les données fragmentaires dont on disposait , en 1969 , lorsque nous avons montré la présence systématique de flavonoïdes et de dérivés d'acides cinnamiques dans les chloroplastes de 11 angiospermes différentes phylogénétiquement (MONTIES , 1969) . Il convient de souligner le fait que la caractérisation directe par microscopie de polyphénols dans des chloroplastes in situ paraît très difficile pour trois raisons principales : l'absence de réactions spécifiques des polyphénols n'interférant pas avec les colorations des chlorophylles et caroténoïdes , la présence de faibles quantités de polyphénols dans les chloroplastes , la présence dans le cytoplasme et dans la vacuole de grandes quantités de polyphénols susceptibles de venir s'adsorber sur les chloroplastes lors de la fixation des tissus . En fait , il n'existe , à notre connaissance , aucune étude concluante conduite in situ par microscopie sur matériel chlorophyllien ; c'est certainement là , les raisons pour lesquelles tous les auteurs déja cités ont recherché les polyphénols dans des chloroplastes isolés . Cependant , compte-tenu de la grande affinité des polyphénols pour les protéines , (HULME et al. , 1964 - GOLDSTEIN et SWAIN , 1965 - LOOMIS et BATTAILE , 1966 - FIRENZUOLI et al. 1969) , on est encore en droit de supposer que la faible quantité de polyphénols , trouvés dans les chloroplastes peut résulter d'une adsorption sur les organites pendant le broyage des feuilles et l'isolement des chloroplastes . La présence de polyphénols dans les chloroplastes isolés pourrait donc être un artéfact ; et cela , même lorsque l'extraction des chloroplastes est pratiquée en milieu aqueux pourtant capabl de solubiliser les polyphénols et donc de limiter , au maximum les processus d'association avec les protéines . Il convient de remarquer , à ce propos , que les tampons aqueux paraissent , de ce fait , préférables aux milieux non aqueux , mélanges d'hexane et de tétrachlorure de carbone , dans lesquels les polyphénols sont insolubles et floculent rapidement avec les protéines .

La présence de polyphénols dans les chloroplastes ne constitue cependant que l'un des cas possibles de localisation subcellulaire particulière de ces composés , de compartimentation , dont nous allons maintenant préciser l'importance à l'aide de quelques exemples .

I - 2 - 3 - Localisation subcellulaire et compartimentation des polyphénols .

Nous avons , en effet , envisagé jusqu'ici seulement le phénomène de localisation des polyphénols à propos de deux effets concernant les seules activités photosynthétiques : l'effet d'écran et l'effet électronique .

Or , il convient de remarquer que la localisation particulière des polyphénols , ainsi que leur localisation au niveau subcellulaire ont été invoquées à propos de nombreux processus physiologiques et en particulier lors de la biosynthèse des polyphénols qui pourraient faire intervenir non seulement les chloroplastes mais d'autres organites ou compartiments cellulaires .

L'exemple le plus fréquemment cité de localisation subcellulaire de polyphénols , est celui des anthocyanes dont l'accumulation dans les vacuoles a été bien décrite depuis longtemps , entre autres par GUILLERMOND (1913) et MIRANDE (1916). Par la suite la même observation a été faite avec les flavonoïdes , GUILLERMOND et GAUTHERET (1933) , MIRIMANOFF (1938) . Il est actuellement admis que cette compartimentation a pour effet d'accumuler les polyphénols sous forme de glycosides dans des compartiments cellulaires à faible activité métabolique , les vacuoles (TOWERS , 1964), et donc , de soustraire le restant des cellules à leurs effets .

Les résultats de GUILLERMOND et de MIRANDE sont intéressants à un second titre : ils concordent pour signaler que la synthèse des anthocyanes débute , dans le cytoplasme , au niveau d'organites ou "cyanoplastes" , qui se chargent en pigment , avant de se dissoudre dans la vacuole . Il nous a paru important de rapprocher ces résultats des observations de DELAVEAU (1968) , puis DELAVEAU et PARIS (1969) et de CHARRIERE-LADREIX (1973) qui ont observé l'accumulation non pas d'anthocyanes , mais de flavonoïdes dans des leucoplastes et , évidemment , dans les vacuoles des cellules correspondantes . Il faut remarquer que ces observations n'ont pu être faites que sur tissus non chlorophyllien à cause des difficultés d'identification in situ des flavonoïdes en présence de chlorophylles et de caroténoïdes . Ce premier ensemble de résultats met nettement en évidence l'importance de la localisation subcellulaire des polyphénols dans les vacuoles d'une part et dans des organites d'autre part . Ces résultats n'excluent d'ailleurs pas la présence de faibles quantités de polyphénols qui ne seraient pas " directement visibles " au microscope , dans les autres compartiments de la cellule .

Le second exemple de localisation subcellulaire des polyphénols concerne plus spécifiquement la biosynthèse des polyphénols . Il est bien établi , que la biosynthèse des polyphénols est sous contrôle génétique mais que ce contrôle peut différer d'une cellule à l'autre dans un même tissu , et cela , aussi bien in vivo (ALSTON , 1964) que in vitro lors de culture de tissus (HESS et HENDRESS , 1973) . De tels résultats sont d'autant plus importants à considérer , ici , que l'expression du génome dépend à la fois de facteurs internes et externes et , en particulier , de l'éclairement (KIRBY et STYLES,1970) , qui est susceptible de modifier quantitati-

vement et qualitativement l'équipement en polyphénols d'un même tissu . Un exemple des plus frappants en a été fourni par FURAYA et GALSTON (1965), qui ont montré que la composition des organes de plantules de Pois (Pisum sativum L.) en flavonosides B-monohydroxylés , de type kaempférol , B-O-dihydroxylés , de type quercétine , et de leurs dérivés acylés par l'acide coumarique dépend non seulement du tissu considéré mais des conditions d'éclairement . Par la suite , ces résultats ont été précisés par HARPER et al. (1970) qui ont vérifié que le traitement lumineux détermine , non seulement le mode de substitution du cycle -B- des flavonosides mais aussi la réaction d'estérification , par l'acide coumarique , du sucre de ces glycosides . Ces derniers auteurs ont constaté , en particulier , que l'incorporation de phénylalanine dans le cycle B (tableau 1B) des flavonosides d'une part , et dans l'acide p-coumarique estérifiant les sucres d'autre part , dépend de l'éclairement ; en particulier , ils ont montré que l'éclairement favorise spécifiquement l'incorporation de phénylalanine dans le squelette carboné des flavonosides . L'une des hypothèses avancée pour expliquer ce résultat est l'existence d'une compartimentation spatiale interne à la cellule , des voies de biosynthèse des flavonoïdes et donc de leurs précurseurs : les acides cinnamiques .

Ce groupe de résultats illustre l'importance des phénomènes de localisation cellulaire et subcellulaire sur la biosynthèse des polyphénols . Réciproquement , on peut supposer que la localisation particulière de certains polyphénols leur permette d'exercer , par formation d'associations moléculaires très diverses , des effets régulateurs sur l'activité des chloroplastes mais aussi d'autres systèmes .

Un premier exemple peut être fourni , dans les chloroplastes de Tomate , par la photorégulation de la ribulosediphosphate-carboxylase (IUB n° 4-1-1-39) par un cofacteur composé d'une protéine et d'acide chlorogénique qui en serait le pigment sensibilisateur . Un tel effet implique non seulement l'existence d'acide chlorogénique dans les chloroplastes mais sa présence au niveau de cette enzyme . Or , compte-tenu du rôle , rapporté in vitro , de l'acide chlorogénique comme cofacteurs des photophosphorylations (TREBST , 1963) , on peut aussi supposer que l'acide chlorogénique peut être lié aux thylakoïdes des chloroplastes . Au total,on est donc conduit à supposer l'existence d'une localisation intrachloroplastique de ce polyphénol .

Pour les mêmes raisons , la régulation in vitro de la glycolate oxydase (IUB n° 1-1-3-1) par l'acide chlorogénique rapportée par CODD et SCHMID (1971) et confirmée récemment par DE JONG (1973) conduit à supposer l'existence d'une localisation subcellulaire des polyphénols , cette fois , au niveau des peroxisomes .

Ainsi , ce second groupe de résultats confirme l'importance de la localisation subcellulaire particulière des polyphénols comme régulateurs possible des activités photosynthétiques . Il convient d'ajouter que de nombreux autres processus physiologiques pourraient dépendre de la localisation subcellulaire des polyphénols . En particulier , ce pourrait être le cas de phénomènes liés à la régulation de la croissance qui dépendraient non seulement de la localisation subcellulaire (TOMASZEWKY , 1964 - PAULET et LIORET , 1965) des polyphénols mais de la présence , dans le même compartiment de systèmes d'enzymes synergiques : de glycosidases capables de modifier les concentrations en polyphénols non glycosidés (PSENAK et VIZAROVA , 1973) . Il est remarquable , en effet , que , tant dans le domaine de la régulation de la croissance que dans celui de la régulation des couplages des photophosphorylations , les aglycones soient , au moins in vitro , des effecteurs plus efficaces que les glycosides correspondants (SCHNEIDER , 1973) .

Ainsi , étant donnée la diversité de ces effets on peut supposer que les polyphénols sont susceptibles de former de nombreux types d'associations moléculaires de stabilité différente . Or , il est possible de mettre en évidence des différences de stabilité de ces associations par extraction progressive du matériel végétal à l'aide de solvants : on définit ainsi une compartimentation d'un constituant donné qui peut être extrait en autant de fractions , ou compartiments , par chacun de ses différents solvants . Le phénomène de compartimentation a été mis en évidence pour de nombreux constituants des plastes : plastoquinones (TREBST , 1963 chlorophylles et caroténoïdes (DEROCHE et COSTES , 1966 a , 1966 b - DEROCHE , 1969) , lipides (COSTES et BAZIER , 1971) , stérols (COSTES et al. , 1971 - KNIGHTS , 1971 - PAULET et al. , 1973) . Nous avons pu mettre , ainsi , en évidence le phénomène de compartimentation des polyphénols dans les chloroplastes et dans les feuilles (MONTIES , 1971 , 1972 a) . A notre connaissance , ce phénomène n'avait pas encore été décrit . Depuis une compartimentation analogue a été décrite dans les feuilles par MAJAK et TOWERS (1973 a , b) ; nous ne discuterons donc ces données qu'après avoir présenté nos propres résultats .

Après avoir précisé l'importance physiologique des phénomènes de localisation des polyphénols nous envisagerons maintenant , le métabolisme des polyphénols par les chloroplastes , puis , l'action des polyphénols sur les activités photosynthétiques de ces derniers .

I - 3 - Métabolisme des polyphénols dans les chloroplastes .

La participation des chloroplastes a été invoquée , au moins *in vitro* , à deux principaux titres dans la biosynthèse des polyphénols ; premièrement, parcequ'ils sont capables de synthétiser différents polyphénols et , deuxièmement , parcequ'ils peuvent oxyder certains polyphénols en *ortho*-diphénols dont nous avons déja rappelé l'importance , à la fois comme système oxydoréducteur réversible , et comme régulateur de croissance .

Nous envisagerons donc successivement ces deux types de résultats .

I - 3 - 1 - Biosynthèse de polyphénols par les chloroplastes

Les différentes réactions qui aboutissent à la biosynthèse des acides cinnamiques et des flavonoïdes à partir des acides aminés aromatiques sont encore mal connues malgré de très nombreux travaux ; nous ne citerons ici que les plus récentes mises au point qui ont été consacrées à ces problèmes (HILLIS et ISOI , 1965 - BIRCH , 1967 - GRISEBACH , 1965 , 1968 - MONEY , 1970 - SMITH , 1973) .

De façon générale , l'acide cinnamique est le précurseur des flavonoïdes ; il provient lui même de la désamination de la phénylalanine par la phénylalanineammonialyase : PAL (figure 1) . Les flavonoïdes résultent de la cyclisation d'un hypothétique p-coumaryl-triacétyl-coenzyme A ; cette cyclisation pouvant se faire de deux façons il peut se former , soit des stilbènes , soit des chalcones (figure 1) . Les chalcones paraissent être les précurseurs communs de tous les flavonoïdes (WONG , 1968 - WONG et GRISEBACH , 1969) qui résulteraient d'une cyclisation peroxydasique des chalcones (RATHMEL et BENDAL , 1972 - WONG et WILSON , 1972 a et b) . Les réactions suivantes , qui déterminent la structure finale de l'hétérocycle des flavoïdès (tableau 1A),sont encore hypothétiques .

La biosynthèse de polyphénols dans les chloroplastes a été rapportée , dès 1967 , par ZAPROMETOV et KOLONKOVA (1967) et par SATO (1967) . Les premiers auteurs ont observé la présence de catéchines dans les chloroplastes de Théier (*Thea sinensis* L.) ; ils ont étudié l'incorporation de $^{14}CO_2$ à la lumière dans ces catéchines et ils ont constaté , après avoir isolé les chloroplastes , que les catéchines présentes dans ces chloroplastes étaient plus marquées que les autres , ils en ont conclu que la synthèse de ces catéchines a lieu *in vivo* dans les chloroplastes . Au contraire SATO (1967) a observé *in vitro* la formation , par des chloroplastes isolés de Saxifrage (*Saxifraga stolonifera* Meerb) , d'une part d'acide caféique par hydroxylation de l'acide p-coumarique (tableau 1B) et d'autre part de coumarine à partir de l'acide *cis* caféique.

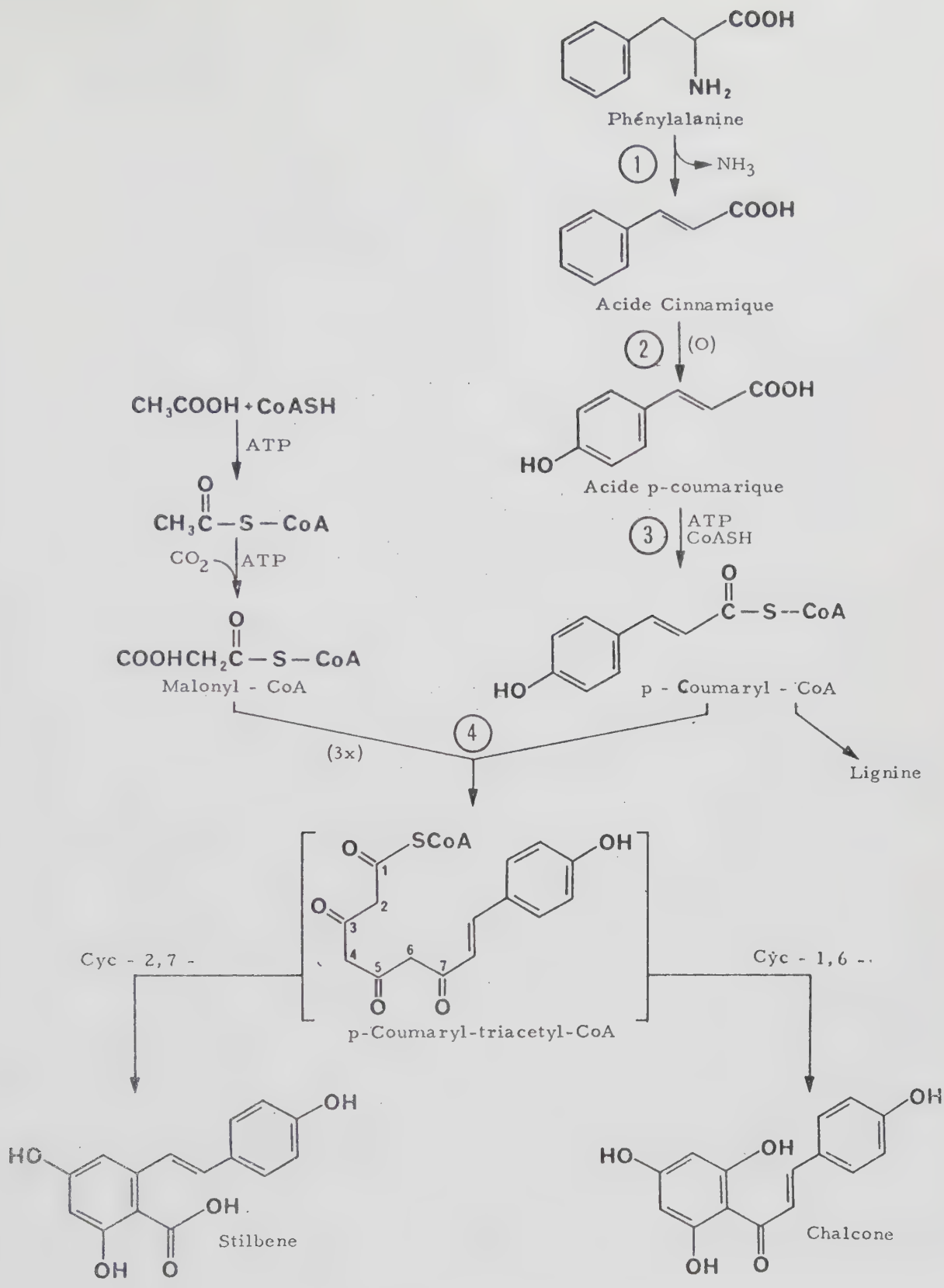


Figure 1 - VOIE DE BIOSYNTHESE DES POLYPHENOLS A PARTIR DE LA PHENYLALANINE .

Les numéros correspondent au nom des enzymes citées dans le texte .

1 - phénylalanine-ammonialyase (IUB :4-3-1-5)
2 - acide cinnamique-4-hydroxylase (IUB : non défini)
3 - p-coumarate-acétylcoenzyme A-(C.A)-ligase (IUB:6-2-13)

Nomenclature des enzymes (I.U.B.) selon FLORKIN et STOTZ (1973) .

Il a montré que cette synthèse résultait de l'activité ortho-diphénol-oxydasique (D P O) de la phénolase . L'intérêt physiologique de cette observation resta cependant limité , puisque SATO (1967) remarquait lui même que les feuilles de Saxifrage ne contiennent pas de coumarines , jusqu'à ce que KINDL (1971) ait montré que les chloroplastes d'Hortensia (Hydrangea macrophylla DC.) , dont les feuilles contiennent des coumarines , sont capables de synthétiser in vitro ces dérivés à partir de tyrosine marquée au ^{14}C . De plus , ce même auteur a montré , (KINDL , 19 que ces chloroplastes d'Hortensia incubés in vitro , à la lumière , en présence de phénylalanine et d'acétate marqués au ^{14}C sont capables de synthétiser des stilbènes (figure 1) qui existent , in vivo , dans les feuilles . Ces résultats doivent être rapprochés de ceux de KANNANGARA et al. (1972) , qui ont rapporté que les chloroplastes de jeunes feuilles d'Orge sont capables de synthétiser de l'acide 6-méthylsalicylique (2-hydroxy,6-méthyl-benzoïque : tableau 1A) par condensation tête à queue de maillons acétate avec du malonylcoenzyme A . Il est remarquable que ni les étioplastes , ni les chloroplastes de feuilles adultes soient capables de réaliser cette synthèse .

Cet ensemble de résultats permet de supposer que , dans les feuilles , les chloroplastes sont des sites de biosynthèse de composés polyphénoliques . Il conviendrait de vérifier la généralité de cette hypothèse , d'autant plus que l'on a rapporté d'autres synthèses séquentielles de polyphénols par d'autres organites de tissus non photosynthétiques : microsomes de racines du Chêne (Quercus pedonculata Erh. (ALIBERT et al. 1972), glyoxysomes d'endosperme du Ricin (Ricinus communis.L. (KINDL et RUIZ , 1971) . Une telle hypothèse conduit à supposer qu'il existe , dans ces organites , les différentes enzymes nécessaires à la synthèse séquentielle de polyphénols . C'est une des raisons pour lesquelles , au cours de ce travail , nous avons recherché dans les chloroplastes deux enzymes clefs de la biosynthèse des polyphénols : phénylalanineammonialyase (PAL) et la phénolase (PO) surtout en raison de son activité monophénoloxydase responsable possible de la synthèse de certains ortho-diphénols .

I - 3 - 2 - Phénylalanineammonialyase chloroplastique .

De très nombreux travaux ont été consacrés depuis ces 10 dernières années à la biochimie , la physiologie et la photorégulation de la PAL ; nous ne rappelerons ici , que les revues récentes et très documentées de HAVIR et HANSON (1972) , ZUCKER (1972) , SMITH (1973) , CAMMM et TOWERS (1973) . La PAL est considérée actuellement , comme l'une des enzymes de

régulation de la biosynthèse des polyphénols et , il est assez surprenant de constater que peu de travaux ont été consacrés à sa localisation subcellulaire .

Ce n'est que récemment que la présence de PAL a été confirmée dans plusieurs types d'organites : microsomes (STAFFORD , 1969 - ALIBERT et al. 1972) , glyoxysomes (KINDL et RUIZ , 1971 a , b) , mitochondries (MINAMIKAWA et URITANI , 1965 - CAMM et TOWERS , 1973 b) isolés de tissus non chlorophylliens . La présence de PAL a été rapportée , de plus , dans les peroxysomes de feuilles d'Epinard et de Tournesol (RUIZ et KINDL , 1971 c) . Dans tous ces cas , la présence de PAL dans ces organites ne semble pas résulter d'adsorption de cette enzyme au cours du broyage ; certains auteurs ont bien vérifié que la PAL n'est pas perdue par les organites , lors des lavages pratiqués après leur isolement . Il convient cependant de remarquer que , de façon générale , la quantité d'enzyme liée aux organites ne représente qu'une partie , parfois inférieure à 10 pour cent de l'activité totale trouvée dans les tissus . Ces derniers résultats sont importants à considérer parce que l'acide p-coumarique , qui résulte de l'hydroxylation en 4 de l'acide cinnamique (figure 1) , et l'acide caféique , qui résulte de l'hydroxylation en 3 de l'acide p-coumarique , sont synthétisés au contraire dans des organites . L'acide cinnamique-4-hydroxylase , en effet , paraît étroitement associé aux microsomes ; elle paraît d'ailleurs se lier à ces organites au cours du vieillissement (CAMM et TOWERS , 1973 b) peut être par des phospholipides puisqu'elle est , au moins in vitro , activée réversiblement par ces composés (BUCHE et SANDEMANN , 1973) . Quand à la formation d'acide caféique , par hydroxylation en ortho d'acide p-coumarique , elle a été observée dans les glyoxysomes (KINDL et RUIZ , 1971 a) , dans les microsomes (ALIBERT et al. 1972) mais aussi dans les chloroplastes (SATO , 1966) .

Il est facile d'imaginer la diversité des effets de régulation qui peuvent résulter de la compartimentation de ces enzymes et c'est là , une des raisons pour lesquelles nous avons recherché dans les chloroplastes non seulement l'existence d'activité PAL mais aussi d'activité MPO .

En 1972 , nous avions signalé brièvement (MONTIES , 1972 b) la présence , très vraisemblable , de PAL dans les chloroplastes . Nous n'avions pu à ce moment tirer des conclusions indubitables parceque nous avions utilisé une méthode de recherche spectroscopique peu spécifique . Nous avons , par la suite , mis au point , dans ce travail , une méthode de dosage de la PAL par densitométrie directe sur couche mince de l'acide cinnamique formé (MONTIES , 1973) qui nous a permis ensuite de montrer

la présence de PAL dans les chloroplastes (MONTIES , 1974) . Entre temps , la présence générale de PAL , étroitement associée aux thylakoïdes des chloroplastes a été démontrée par LÖFFELHARDT et al. (1973) .

I - 3 - 3 - Phénolase chloroplastique .

La présence dans les chloroplastes de phénolase capable d'oxyder les polyphénols en présence d'oxygène (polyphénoloxydase) , rapportée pour la première fois par ARNON (1949) , a été confirmée souvent et en particulier par TOLBERT (1973) qui reconnaissait lui aussi " l'existence d'une immense activité polyphénoloxydase latente étroitement associée aux structures lamellaires chloroplastiques sans pouvoir expliquer son rôle " . Le mécanisme de réaction de la phénolase restant hypothétique (HAMILTON , 1969 - MAKINO et MASON , 1973) nous nous bornerons à distinguer ici , de façon globale , l'existence de deux activités :

1 - MPO ou monophénoloxydase ou monophénolase (*)

monophénol + oxygène ⟶ O-diphénol (1)

2 - DPO ou diphénoloxydase ou diphénolase (*)

ortho-diphénol + oxygène ⟶ ortho-quinone + eau (2)

L'existence de deux activités enzymatiques , clairement caractérisées dès 1944 par NELSON et DAWSON (1944) qui était encore discutée en 1966 (MASON et KERTESZ , 1966) paraît maintenant généralement admise . Malgré tout , l'étude des réactions d'hydroxylation des phénols reste très délicate parceque d'autres enzymes , mono-oxygénases , (ULLRICH , 1972) paraissent capables de catalyser des réactions de type MPO .

La présence de phénolase dans des organites autres que les chloroplastes a été confirmée : particules de FREY-WISSLING (COUPE et al. , 1972) , mitochondries de feuilles (HAREL et al.,1965 - BOKUTCHAVA et al. , 1970 - ODA et al. , 1973) ; on a pu solubiliser la phénolase

---

(*) Selon la nouvelle nomenclature proposée par FLORKIN et STOTZ (1973) il n'existe pas moins de dix termes synonymes pour désigner "la" phénolase . La dénomination nouvelle (IUB = 1-14-18-1) ne précise que l'activité "monophénol-mono-oxygénase" alors que la précédente ne faisait apparaître que l'activité "ortho-diphénol-oxydase" (IUB : 1-10-3-1) . Comme il est possible de mettre en évidence séparément ces deux activités nous emploierons encore ici le terme "phénolase" (MASSON , 1955) en précisant éventuellement que l'activité considérée est de type monophénolase : (MPO ou monophénol-mono-oxygénase) ou diphénolase (DPO ou ortho-diphénol-oxygène-oxyréductase) ; cette distinction ne présume rien sur le mécanisme même des réactions .

mitochondriale au moyen de détergents et montrer qu'elle diffère par sa spécificité vis à vis de substrats de celle des chloroplastes correspondants. Quand à la phénolase des chloroplastes, il est bien montré par microscopie (CSANINSKI et CATESSON, 1972) et surtout, par analyse chimique et solubilisation des membranes chloroplastiques à l'aide d'alcools, d'enzymes ou de détergents, qu'elle est étroitement associée aux thylakoïdes. Il convient de souligner que de nombreuses "isoenzymes" ont été mises en évidence, et il est confirmé que leurs propriétés dépendent de l'état des plantes et du mode d'isolement de l'enzyme : en particulier, l'activité MPO peut être perdue par dénaturation (HAREL et al. , 1973). Les données ainsi obtenues sont d'autant plus difficiles à utiliser que l'on sait que la spécificité des phénolases dépend de leur degré de purification et, en particulier, l'élimination de polyphénols absorbés (COGGON et al. , 1973) qui peuvent servir de cofacteur par des chaînes d'oxydations couplées (MONTIES, 1966 b). Il est vraisemblable que les difficultés qu'il y a à caractériser cette enzyme viennent premièrement du fait qu'elle est tétramérique et que ses propriétés dépendent du mode de fixation de ses constituants : chaînes protéiques (ARNAUD, 1968), atomes de cuivre (KERTES et al. , 1972), deuxièmement, du fait qu'il existe des effecteurs protéiques qui pourraient même être des proenzymes ou "formes latentes" (TREBST et WAGNER, 1962 - VILOVA et al. , 1973) et troisièmement du fait que l'activité des enzymes liées, en phase hétérogène membranaire, diffère considérablement et de façon générale de celles que l'on peut observer en solution diluée (ENGASSER et HORVATH, 1973) après les avoir "solubilisées" à partir des membranes.

Compte-tenu de ces faits, on ne saurait être surpris des désaccords et controverses (BUTT et VAUGHAN, 1972 - STAFFORD et BLISS, 1973 - SCHILL et GRISEBACH, 1973) concernant les rôles de la phénolase chloroplastique. Nous ne chercherons à dégager ici, brièvement, que quelques données, qui nous semblent actuellement les moins contestables : tout d'abord, la formation en fonction de l'éclairement de complexes à activité phénolasique, puis la photorégulation de leur activité monophénol-oxydasique en nous limitant ainsi à la seule activité phénolase.

L'existence systématique d'activité MPO dans les chloroplastes a été établie par SATO (1966) ; nous avons vu précédemment (page 13) que l'activité DPO a été ensuite observée par ce même auteur. Par la suite, ces observations ont été confirmées puis étendues aux flavonoïdes (VAUGHAN et al. 1969 - BUTT et VAUGHAN, 1972). Ces auteurs ont montré en particulier que de nombreux composés réduits tels le NADH, nicotinamideadéninenucléotide réduit, la 2-amino-4-hydroxy-6, 7-diméthyl-5, 6, 7, 8-tétraphydroptérine ou l'ascorbate, dont la présence est possible dans les chloroplastes

(GERHARDT , 1964) , sont nécessaires pour que la phénolase chloroplastique exerce son activité MPO . Si l'on représente par RH_2 le second substrat réduit et si l'on note A(OH) un quelconque des monophénols substitués (tableau 2) la phénolase chloroplastique est capable de le convertir en l'orthodiphénol correspondant (tableau 2) selon l'équation globale suivante (3) :

$$RH_2 + A(OH) + O_2 \longrightarrow R + A(OH)_2 + OH_2 \qquad (3)$$

C'est évidemment l'accumulation , par photosynthèse , de composés réduits dans les chloroplastes du type NADH , ascorbate ou ptérines , qui conditionne a priori la possibilité d'une activité MPO chloroplastique . Or , de nombreux auteurs ont constaté que , si la synthèse de polyphénols de type ortho-diphénol peut avoir lieu à l'obscurité , leur accumulation en grande quantité se déroule de façon parallèle à l'organisation du système chloroplastique à la lumière . Compte-tenu des résultats précédents , ils ont supposé qu'il pouvait exister une relation entre ces deux phénomènes (CARLIN et Mc CLURE , 1973 - STAFFORD et BLISS , 1973) .

Pour vérifier cette hypothèse , STAFFORD a cherché à montrer que l'activité phénolase peut , lors du verdissement , " s'organiser " dans des complexes de forte masse moléculaire et , en particulier , se " lier " à des organites . Dans un premier temps , STAFFORD (1969) puis STAFFORD et BALDY (1970) ont montré qu'il existe deux systèmes d'hydroxylation des monophénols dont l'un , lié aux microsomes , est fonctionnel à l'obscurité et dans les tissus non chlorophylliens ; ce système n'a pas d'activité phénolase classique . Au contraire , lors du verdissement et en quelques heures , il apparaît un second système associé à des organites qui possède les activités classiques (MPO et DPO) de la phénolase . Récemment STAFFORD et BLISS (1973) ont montré une " organisation " de ces activités qu'ils ont interprété par une activation consécutive à la fixation sur les membranes chloroplastiques et mitochondriales . L'ensemble de ces résultats est cohérent , il mérite évidemment d'être confirmé , mais , il convient de remarquer que les auteurs eux-mêmes ont souligné la fragilité des associations enzymes-organites , ce qui expliquerait le manque de reproductibilité observé lors des recherches d'activités MPO . La spécificité différente de la phénolase in vivo et in vitro pourrait être expliquée de même , si l'on admet qu'elle dépend de " l'organisation " des membranes chloroplastiques ; cette dernière remarque permettrait d'expliquer les résultats de SCHILL et GRISEBACH (1973) sans toute fois admettre leurs réserves formulées quand au rôle de la phénolase chloroplastique dans la biosynthèse des ortho-diphénols .

Tableau 4 - Principaux effets de la lumière sur la présence et le mode de substitution B-monophénol et B-ortho-diphénol des flavonols , C-glycosylflavones et anthocyanes .

raitement et observé)	Eclairement (durée, qualité, intensité)	Flavonoïde -4'-OH	Flavonoïde -3',4'-diOH	Anthocyane -3',4'-diOH
scurité férence)		(+) A,B,C,D	(+) B	
lairement faible bref hytochrome)	5 à 10 min. Rouge ou Bleu ($0,1\ J.cm^{-2}.\ sec^{-1}$)	+ A,B,C,D	+ B	
lairement faible prolongé hytochrome*)	30 à 60 min. Blanche (3000 Lux) ou Bleue ($0,1\ J.cm^{-2}.\ sec^{-1}$)	+ C,D	+ C,D	
lairement intense prolongé éactions HE)	Plusieurs heures Blanche (10 000 Lux) ou Rouge , Bleue ($1\ J.cm^{-2}\ .\ sec^{-1}$)	+ + A,B,C,D	+ + A,B C,D	+ + C

(*)

D'autres réactions et effets de type haute énergie (HE) sont possibles Les quantités relatives (+) traces , + présent , ++ accumulation sont indiquées seulement si la présence du flavoïde est rapportée dans les 4 références A,B,C,D suivantes : pour les flavonols , chez Pisum sativum par RUSSEL et GALSTON (1967) dans l'internoeud sous-apical (A) et par SMITH et HARPER (1970) dans le bourgeon terminal (B) ; pour les C-glycosylflavones , flavonols et anthocyanes chez Spirodela (C) par Mc CLURE (1968 , 1970) , pour les C-glycosylflavones chez Hordeum (D) par Mc CLURE (1970 , 1973) .

La photorégulation de la biosynthèse des ortho-diphénols a été étudiée récemment par Mc CLURE et al. (Mc CLURE 1970 , Mc CLURE et WILSON 1970 , CARLIN et Mc CLURE 1973) . Il est bien établi (tableau 4) que si la biosynthèse des ortho-diphénols dépend du génome des plantes son expression phénotypique dépend du phytochrome et en particulier de la réaction dite " haute énergie " (réaction HE) . Certains auteurs (DOWNS et al. 1965 - SCHNEIDER et STIMSON , 1972 - STIMSON , 1973) ont même suggéré l'existence d'une relation étroite entre réaction HE et photophosphorylations cycliques d'après la seule ressemblance des spectres d'action de ces réactions aux environs de 700 nm . Nous avons résumé sur le tableau 4 les principaux effets de photorégulations observés . On peut vérifier à l'aide de ce tableau , que le déterminisme du mode d'hydroxylation du cycle B des flavoïdes dépend de l'éclairement mais aussi des organes végétaux étudiés (page 6) . On peut aussi constater que les " éclairements " utilisés pour provoquer les réactions HE sont tout à fait suffisants pour induire le verdissement de plantes étiolées . C'est l'une des raisons qui ont conduit à supposer la participation des chloroplastes aux réactions HE de biosynthèse des flavoïdes . En effet les chloroplastes paraissent à priori capables d'hydroxyler le cycle B des flavonoïdes grâce , d'une part à l'activité MPO chloroplastique et , d'autre part , à l'accumulation de réducteurs RH_2 indispensables à l'activité MPO . Les derniers résultats de CARLIN et Mc CLURE (1973) paraissent bien confirmer ces hypothèses. En effet , ces auteurs ont établi pour la première fois le spectre d'action entre 380 et 740 nm de la biosynthèse de deux C-glycosylflavonosides respectivement B-mono- et B-dihydroxylés . Ils ont constaté des différences de réversibilité des effets d'éclairement rouge clair -rouge sombre et , surtout , de forme des spectres d'action de la biosynthèse de ces deux types de polyphénols . Ils ont conclu qu'il existe , à côté du phytochrome , un second système photorécepteur , responsable de la synthèse des ortho-diphénols dont l'induction par réaction HE n'est pas réversible par action du phytochrome . Ils ont donc émis l'hypothèse que ce second système pourrait être le système plastidial , capable , une fois organisé d'hydroxyler les monophénols grâce à l'activité MPO de la phénolase .

En résumé , nous pouvons donc affirmer que les chloroplastes sont capables , au moins in vitro , de synthétiser certains polyphénols et qu'ils favorisent l'accumulation de certains d'entre eux grâce au pouvoir réducteur de la photosynthèse . Ces résultats doivent , dans leur ensemble, être précisés . Ils nous ont paru d'autant plus importants à regrouper ici , que les composés polyphénoliques sont capables d'interagir directement sur les activités photosynthétiques , comme nous allons le voir maintenant .

I - 4 - Polyphénols et activités photosynthétiques.

Nous avons contaté que les polyphénols sont susceptibles d'exercer sur la photosynthèse un effet d'écran, effet indirect, du fait de leurs propriétés de pigments ; nous examinerons maintenant six principaux types d'effets directs dus à leurs propriétés oxydo-réductrices et résultant de leur interaction directe avec les chaînes de transfert d'électrons des chloroplastes.

I - 4 - 1 - Activité DPO de la phénolase et photosynthèse.

C'est WARBURG et ses collaborateurs qui ont suggéré, puis discuté en détail, (WARBURG et al. , 1959) la participation de la phénolase à la photosynthèse. Ils ont tout d'abord montré que la para-benzoquinone catalyse, de façon stoechiométrique, le dégagement d'oxygène induit par la lumière sur des chloroplastes isolés d'une part mais aussi sur des Chlorelles (Chlorella sp.)intactes. Au cours de ces réactions, la p-quinone sert d'accepteur terminal d'électron ; elle peut être photoréduite à l'état de diphénol (*) correspondant. Pour expliquer l'effet catalytique de la quinone dans ces réactions, ces auteurs ont imaginé une réoxydation du p-diphénol en présence d'air à l'état de p-quinone ; ils ont donc supposé que, in vivo l'ortho-benzoquinone correspondant à l'acide chlorogénique pouvait jouer ce rôle d'accepteur d'électron et donc, que la phénolase chloroplastique catalysait, in vivo, la réoxydation de ces diphénols par une réaction de type DPO (réaction 2 page 15). Il est maintenant bien établi que les ortho-diphénols, tels que l'acide chlorogénique, ne sont pas, dans ce cas, réoxydés par la phénolase dont l'activité DPO est en général latente (TREBST et WAGNER, 1972 - TOLBERT, 1973) mais, au contraire, par une photooxydation sensibilisée (TREBST et BOK, 1961). Il convient de remarquer cependant que les ortho-quinones ainsi formées sont susceptibles de servir d'accepteur terminal d'électron et donc de permettre, entre autre, le dégagement d'oxygène photosynthétique par des chloroplastes isolés. Il est malgré tout important d'envisager l'existence d'une activité DPO chloroplastique parce qu'elle peut, à priori, provoquer la consommation d'une part de l'oxygène qui est dégagé par les chloroplastes et, d'autre part, du "pouvoir réducteur" qui peut être utilisé, soit par voie enzymatique sous forme de RH_2 par l'activité enzymatique MPO (réaction 3, page 17), soit par voie non enzymatique pour la réduction des quinones et, en particulier,des orthoquinones (WOSILAIT et al. 1954) par les composés réducteurs RH_2 accumulés pendant la photosynthèse. Effectivement,quelques résultats expérimentaux confirment l'existence de tels effets . C'est ainsi que MAYER (1964)

(*) Pour raison d'homogénéité, nous utiliserons le terme "diphénol" de préférence à son synonyme "hydroquinone" employé habituellement dans les recherches sur la photosynthèse.

a montré que le " pouvoir réducteur " RH_2 , résultat de l'activité photosynthétique , accroît l'activité MPO de la phénolase , et que , inversement , l'activité DPO réduit le dégagement d'oxygène photosynthétique . Il est remarquable que les"plastes"de feuilles étiolées possèdent le même type d'activité phénolase que les plastes eux-mêmes (MAYER , 1964) ; il convient de signaler cependant que la comparaison de ces activités , faite in vitro , n'est peut être pas strictement représentative de ce qui est in vivo . En effet , il a été très clairement montré par SIEGENTHALER (1968) puis SIEGENTHALER et VAUCHER-BONJOUR (1971) que , au cours du vieillissement des chloroplastes in vitro , l'activité DPO de la phénolase croît parallèlement avec la désorganisation du système chloroplastique . De tels processus pourraient , compte-tenu des précédents rappels , avoir une grande importance in vivo et in vitro ; il ne semble pas cependant qu'ils aient été davantage précisés .

I - 4 - 2 - Polyphénols et accepteur primaire du photosystème I (PS I)

Jusqu'en 1972 , le rôle de la ferrédoxine , comme accepteur primaire du PS I était contesté et la nature de ce dernier restait inconnue ; il semble que la situation tende à sa clarifier depuis que l'on a confirmé l'existence de plusieurs formes de ferrédoxines dans les chloroplastes (BEARDEN et MALKIN , 1972 - TSUJIMOTO et al. , 1973 - KE et al. 1973) .

Ces auteurs ont en effet montré , qu'il existe au moins deux formes de ferrédoxines dont l'une est la ferrédoxine soluble . Il est actuellement admis que la ferrédoxine soluble ne peut être l'accepteur primaire PSI , pas plus d'ailleurs que ne le serait le composé décrit par YOCUM et SAN-PIETRO (1970) sous le sigle F.R.S. (ferredoxin reducing substance) que l'on a aussi , un moment , supposé être l'accepteur primaire (TREBST , 1971 - REGITZ et OETTMEIER , 1972) . Il semble que l'accepteur terminal soit l'une des formes liées aux thylakoïdes de la ferrédoxine et que le FRS qui lui est associé , joue seulement un rôle d'intermédiaire dans le transfert des électrons vers le NADP via la ferrédoxine soluble et la ferrédoxine - NADP - réductase . L'intérêt que nous avons porté au FRS et , en particulier , aux résultats de TREBST , REGITZ et OETTMEIER cités plus haut , vient du fait que ces auteurs ont isolé , à partir de chloroplastes , un facteur hydrosoluble composé de protéines et de composés polyphénoliques (flavonoïdes et acides cinnamiques) qu'ils ont soigneusement purifié et fractionné et qui possède précisément une activité FRS .

Il convient de ramarquer , de plus , qu'un facteur analogue au FRS , intermédiaire entre le système I et la ferrédoxine , décrit sous le nom de CRS (Cytochrome Reducing Substance) et , que l'on peut isoler des extraits solubles de chloroplastes selon la méthode de FUJITA et MYERS (1971) , semble lui aussi contenir des dérivés d'acides cinnamiques : il

n'est pas de type quinone comme l'ont supposé ces auteurs . En effet OETTMEIER et LOCKAU (1973) ont montré que le CRS isolé de chloroplastes d'Epinard doit son absorption dans le proche ultraviolet , à la présence d'acide p-coumaroyltartrique qui serait actif , vraisemblablement , dans le CRS sous forme de complexe de fer .

Tous ces résultats , cependant encore fragmentaires , ont contribué à bien confirmer la présence systématique de polyphénols dans les chloroplastes que nous avions rapportée par ailleurs ; nous ne les discuterons donc qu'après avoir présenté nos propres résultats .

I - 4 - 3 - Polyphénols et absorption transitoire dans le proche UV .

Les résultats , concernant l'absorption dans le proche UV des polyphénols chloroplastiques , méritent d'être rapprochés des résultats concernant les variations transitoires d'absorption rapportées entre 250 et 400 nm lors d'excitation photosynthétique par des éclairs . Ces résultats dus principalement à WITT et collaborateurs ont été revus récemment (WITT , 1971) .

Ces auteurs ont observé , par la méthode des spectres de différences, des variations faibles et brèves d'absorption dans le proche ultraviolet consécutives à l'exposition de chloroplastes d'Epinard ou de Chlorelles intactes sous des éclairs de lumière rouge .

Ces auteurs ont montré , sur la base de données cinétiques , que certaines de ces variations peuvent être rapportées aux plastoquinones ; cependant d'autres variations transitoires , de plus longue durée de vie (STIEHL et WITT , 1968) n'ont pu être rapportées à des constituants connus . Compte-tenu du fait que des variations transitoires analogues ont été rapportées , de façon générale , avec d'autres phénols simples (FREITELSON et HAYON , 1973) il se pourrait que des composés polyphénoliques participent eux aussi à ces variations d'absorption . A notre connaissance , cette hypothèse n'a jamais été encore envisagée ; elle nous paraît d'autant plus fondée que récemment (KE , 1973) a confirmé l'existence de variations analogues sur des particules photosystème I isolées de chloroplastes d'Epinard , qui nous venons de le voir précédemment , contiennent des polyphénols dans les fractions FRS ou CRS .

I - 4 - 4 - Polyphénols et photophosphorylation photosynthétique .

Paradoxalement , en apparence tout au moins , de nombreux travaux ont été consacrés à la participation des polyphénols aux photophosphorylations alors même que la présence de ces substances n'avait pas même

été recherchée dans ces organites . C'est ainsi que , dès 1963 , TREBST (1963) a présenté une remarquable revue dans laquelle figurent les principaux types d'effets des ortho-diphénols et quinones correspondantes sur la photosynthèse , alors que ce n'est qu'en 1962 , et pour la première fois , que fut clairement établi la présence de flavonoïdes dans les chloroplastes et leur rôle de cofacteur des photophosphorylations cycliques aérobies (KROGMAN et STILLER , 1962) . Les quatre principaux effets directs des polyphénols sont les suivants :

Premièrement , ils peuvent être cofacteurs des photophosphorylations non cycliques . Compte-tenu des résultats de WARBURG et al. 1959 et de TREBST et ECK (1961) rappelés précédemment , on est conduit à admettre (TREBST , 1963) que les quinones , formées par photooxydation sensibilisée des polyphénols , servent d'accepteur terminal d'électrons ; en reprenant les notations précédentes on peut donc écrire :

$$A(O)_2 + H_2O + ADP + Pi \longrightarrow A(OH)_2 + ATP + 1/2\ O_2 \qquad (4)$$

Evidemment , le dégagement stoéchiométrique d'oxygène ne peut être observé que si la quinone n'est pas autoxydable ou si la phénolase chloroplastique n'a pas d'activité DPO , comme nous l'avons vu plus haut . Compte-tenu des valeurs des potentiels d'oxydo-réduction des ortho-diphénols (tableau 2) et des résultats de TREBST (1963) , les ortho-diphénols végétaux ne paraissent pouvoir interférer avec le dégagement d'oxygène qu'après activation , enzymatique ou non .

Deuxièmement , les ortho-diphénols peuvent être des cofacteurs des phosphorylations cycliques mais ne le sont qu'en présence d'oxygène , qui est nécessaire pour qu'il y ait formation de quinones . Les quinones ainsi formées sont ensuite photoréduites . Ainsi , les polyphénols jouent donc le rôle de cofacteurs de photophosphorylations dites " pseudocycliques " qui sont en réalité des " phosphorylations non cycliques à oxygène " ; au total on a donc :

$$A(O)_2 + H_2O + ADP + Pi \longrightarrow A(OH)_2 + ATP + 1/2\ O_2 \qquad (5)$$

$$A(OH)_2 + 1/2\ O_2 \longrightarrow A(O)_2 + H_2O \qquad (6)$$

On peut donc remarquer , que dans le cas des photophosphorylations non cycliques , les polyphénols agissent comme substrat , alors que dans ce second cas , ils agissent comme catalyseur ; d'après les résultats de KROGMAN et STILLER (1962) et TREBST (1963) , les concentrations optimum pour observer ces effets sont de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} M tant avec les acides cinnamiques qu'avec les flavonoïdes .

Troisièmement , les ortho-diphénols , alors même qu'ils jouent le rôle de catalyseur des photophosphorylations , peuvent permettre la for-

mation de H_2O_2 dans les chloroplastes . La formation d'hydroperoxyde par les chloroplastes en présence de p-quinone , qui correspond à la réaction de MEHLER (1951) , a été confirmé par WARBURG et al. (1959) ; pour rendre compte globalement du phénomène il suffit de remplacer l'équation (6) par :

$$A(OH)_2^{\cdot} + O_2 \longrightarrow H_2O_2 + A(O)_2 \qquad (6')$$

Ce sont TREBST et ECK (1961) qui ont montré les premiers , sans ambiguité , que l'ortho-quinone de l'acide chlorogénique peut dans les chloroplastes catalyser la formation d'hydroperoxyde selon l'équation globale (7) résultant de (5) et de (6')

$$H_2O + 1/2\ O_2 + ADP + Pi \longrightarrow H_2O_2 + ATP$$

Pour que toutes ces réactions soient possibles , il faut que les polyphénols soient oxydés en quinone par les chloroplastes . Nous avons rapporté que la phénolase , envisagée par WARBURG et al. (1959) comme catalyseur de cette réaction , avait été exclue par TREBST et collaborateurs . C'est ce dernier point que nous envisagerons maintenant .

Quatrièmement donc les polyphénols peuvent être oxydés par les chloroplastes . Par une remarquable série de travaux , qu'il a résumés dès 1963, TREBST a pu montrer que l'oxydation des ortho-diphénols (acide chlorogénique , dopamine) , par les chloroplastes , n'était le fait ni de la phénolase ni d'autoxidation , mais au contraire résultait d'une photooxydation sensibilisée par la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques puisqu'entre autre elle est inhibée par le DCMU , mais dont le mécanisme lui-même est resté depuis hypothétique . Il nous a semblé possible que la formation d'ions superoxydes , $O_2^{\cdot -}$, par exemple au niveau de la ferrédoxine-NADP-réductase , réaction qui a été confirmée (NAKAMURA et KIMURA , 1971) pouvait permettre d'expliquer cette photooxydation sensibilisée d'autant plus aisément que les polyphénols sont capables de former des complexes moléculaires avec les flavines (MONTIES , 1973) .

1 - 4 - 5 - Polyphénols et couplage des photophosphorylations photosynthétiques .

On est en droit de supposer que , si les polyphénols ont une localisation intrachloroplastique , ils sont susceptibles d'interférer en plusieurs points des chaînes de transfert d'énergie par l'intermédiaire d'association diverses . De ce fait , les polyphénols pourraient provoquer soit l'activation , soit l'inhibition de ces transferts ; on est donc conduit à admettre que les effets observés selon les concentrations peuvent être de sens contraire et passer par des maximums . Les rares données récentes dont on dispose , concernant l'effet de polyphénols sur les couplages et transferts énergétiques dans les chloroplastes paraissent confirmer cette hypothèse (PROKORCHIK , 1972 - AKULOVA , 1972) .

On sait depuis longtemps que , de façon générale , les polyphénols peuvent soit découpler (augmenter les transferts d'électrons non phosphorylants) soit inhiber (diminuer le transfert d'électrons phosphorylants) les échanges d'énergie (GOOD et al. , 1966). Peu d'études détaillées ont été faites sur les chloroplastes et leurs résultats sont d'autant plus difficiles à interpréter que de très nombreux sites et mécanismes sont a priori équivalents pour produire ces effets . L'état des sites récepteurs et donc la structure des polyphénols peuvent aussi déterminer le type d'effet produit , c'est bien ce qui a été vérifié par GOOD et al. (1966) qui ont constaté que la phlorétine , une dihydrochalcone hydroxylée (tableau 1A) découple les photophosphorylations alors que le glycoside correspondant les inhibe . Pour la même raison , et de l'avis même de SCHNEIDER (1974) , l'effet " plutôt découplant " de flavonols sur les photophosphorylations de chloroplastes d'Epinard ne peut être extrapolé sans précautions in vivo ; il convient de souligner que cet auteur a montré que non seulement la glycosylation des hydroxyles mais simplement la méthylation d'un seul d'entre eux suffit à modifier leur effet découplant .

En ce sens , les résultats de PROKORCHIK (1972) et surtout AKULOVA (1972) , rapportés plus haut , ont certainement une plus grande signification physiologique puisque ils ont été obtenus avec des polyphénols et des chloroplastes isolés de la plante correspondante . En particulier , il est remarquable que le kaempférol-glycoside et son dérivé acylé aient des effets antagonistes sur les photophosphorylations des chloroplastes de Pois dont ils ont été isolés (AKULOVA et al. , 1972) .

Il est certain que tous ces résultats sont encore trop fragmentaires pour que l'on puisse en tirer des conclusions générales ; ils semblent indiquer cependant une participation générale des polyphénols à la régulation des activités enzymatiques . C'est sur ce dernier point que nous terminerons cette revue bibliographique .

1 - 4 - 5 - Régulation d'enzymes par les polyphénols

Les polyphénols ont la réputation d'inhiber les activités des enzymes solubles ou membranaires ainsi que celles des organites . Ils sont en effet susceptibles de se lier de diverses façons aux protéines (MONTIES , 1966 b) ; de ce fait , leur "mauvaise réputation" n'est pas surfaite . De nombreuses techniques ont été proposées pour se protéger de ces effets sources d'artéfacts ; prises séparément aucune de ces techniques n'a de valeur générale et donc nous mentionerons seulement ici l'excellente mise au point de ANDERSON (1968) sur ces problèmes et leurs remèdes .

En conséquence , il pourrait sembler paradoxal de rechercher des effets régulateurs et même activateurs d'enzymes par les polyphénols : de tels effets pourtant , ont été rapportés . Les moins inattendus sont ceux que l'on peut expliquer par des " effets électroniques " des polyphénols sur des enzymes catalysant des oxydo-réductions (oxydo-réductases , FLORKIN et MASON , 1973) . Ce pourrait être le cas de l'acide indolacétique-oxydase et de diverses peroxydases qui sont activées par des monophénols (BAYSE et MORRISON , 1971 - WARDALE , 1973 - TAFURI et al. 1972) . Ces effets sont d'autant plus remarquables que les ortho-diphénols correspondant à ces activateurs sont , en général , inhibiteurs de ces mêmes enzymes ; cette particularité pourrait conférer à l'activité MPO de la phénolase un rôle fondamental dans la régulation de ces enzymes .

De ces " effets électroniques " on peut rapprocher l'activation , en présence d'oxygène , de la glycolate-oxydase par les acides caféique et chlorogénique (CODD et SCHMID , 1971 - DE JONG , 1973) . Comme la participation directe des quinones à cette activation parait devoir être exclue , et que ces acides sont susceptibles de former des complexes moléculaires avec la riboflavine (MONTIES , 1973) , on peut supposer que les polyphénols exercent leur effet activateur en formant des complexes électroniquement actifs avec le groupement flavine de cette enzyme . En effet , dans un tel complexe , l'activation résulterait non pas de la formation de quinone , par réduction divalente en ortho-diphénols , mais de la formation de composés de type semi-quinone , résultat de leur réduction monovalente . La possibilité d'un tel mécanisme paraît confirmée par le fait que l'inhibition de la glycolate-oxydase par la lumière bleue est reversée par la présence d'acide chlorogénique . En effet , il est bien établi que les flavoprotéines sont capables , sous la lumière bleue , de former par réduction monovalente de l'oxygène, des ions superoxyde $O_2^{\cdot -}$ susceptibles d'inhiber leur fonctionnement (LAVELLE et al. 1973) . Par ailleurs , on sait , que les polyphénols et en particulier l'acide caféique et les ortho-diphénols peuvent servir de piège radicalaire à l'ion monovalent $O_2^{\cdot -}$ (MILLER et RAPP , 1973 - RAPP et al. 1972) . Il paraît raisonnable de supposer que la protection de l'activité de la glycolate-oxydase contre la lumière bleue par les ortho-diphénols résulte de leurs propriétés d'être des pièges radicalaires grace à cette même réaction de réduction monovalente qui permettrait d'expliquer le mécanisme d'action de cette enzyme .

De façon beaucoup plus générale , étant donné la facilité avec laquelle des ions $O_2^{\cdot -}$ peuvent être formés , entre autre , au niveau des flavoprotéines (BALNY et DOUZOU , 1974) , on peut supposer que , à côté du premier

" effet électronique " activateur des polyphénols sur les enzymes , il peut exister un second " effet électronique " de protection , cette fois , des enzymes contre les oxydations qui pourraient avoir une portée beaucoup plus générale .

Enfin , un autre type de photorégulation d'activités enzymatiques par les composés phénoliques pourrait correspondre à l'activation rapportée dans le proche ultraviolet de la ribulose-diphosphate-carboxylase (IUB : 4-1-1-39) . On peut supposer , en effet , qu'il a lieu par isomérisation cis-trans d'un des cofacteurs , l'acide chlorogénique , (WILDNER et al. , 1971) de façon analogue à celle que nous avons décrite sur la PAL (MONTIES , 1973) .

D'autres effets d'activation d'enzymes par les polyphénols ont été rapportés ; les réactions sont cependant décrites de façon trop imprécise et sont souvent " éloignées " du domaine de la photosynthèse . C'est le cas , par exemple , des réactions de formation de complexes entre métaux , flavines et polyphénols et des effets de régulation exercés sur certaines oxydases par les composés phénoliques . On peut supposer que les polyphénols possédant des activités FRS ou CRS exercent leurs effets par formation de tels complexes . Il pourrait en être de même dans le cadre des phosphorylations puisque SCHNEIDER (1974) a montré , par exemple , que l'ATPase dépendante du calcium activable par la trypsine , qui semble être le facteur de couplage des photophosphorylations , est activée ou inhibée selon les concentrations en flavonols ajoutés dans le milieu d'incubation utilisé pour doser cette enzyme .

Ainsi , l'ensemble des résultats que nous venons de présenter , permet de supposer que les polyphénols ne sont pas seulement des " inhibiteurs systématiques " des activités cellulaires en général et photosynthétiques en particulier . Cependant compte-tenu de la très grande réactivité de ces substances , nous avons cherché à préciser non pas des effets , mais plutôt les conditions même nécessaires à l'existence de ces effets . C'est la raison pour laquelle nous avons , après avoir identifié les flavonosides des feuilles de Melon Cucumis melo , recherché tout d'abord la présence systématique de polyphénols dans les chloroplastes . Etant donnée l'importance et la diversité des associations moléculaires que peuvent former les polyphénols , nous avons ensuite cherché à mettre en évidence une éventuelle compartimentation de ces substances par la méthode d'extraction progressive à l'aide de solvants . Enfin cherchant à préciser le métabolisme des polyphénols au niveau des chloroplastes , nous avons recherché la présence de PAL et d'activité MPO de la phénolase dans ces organites .

II - METHODES D'ANALYSE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES

II - 1 - Plantes étudiées et conditions de culture .

Les expériences ont été faites sur des feuilles de Tomate (Lycopersicum esculentum Mill. , var. Marmande) , de Melon (Cucumis melo L. , var. Doublon Risser) et de Blé (Triticum sativum L. , var. Florence Aurore) . Les plantes sont cultivées sous serre ou bien dans une chambre climatisée (ventilation continue , température 20°C nuit et 25°C jour , humidité de 60 à 90%) . Sous serre , on apporte un supplément de lumière blanche (Lampes MIXOPAL - 16h/jour - 4000 à 10 000 lux) , la culture étant faite sur un mélange terreau-sable (2/3 - 1/3 vol.) . En chambre climatisée , les plantes reçoivent de la lumière blanche (tubes GE , Cool-white - 16h/jour , 10 000 à 25 000 lux) , la culture étant faite sur sable avec apport de solution nutritive (COSTES et MILHET , 1970) .

Les autres plantes , qui ont été utilisées pour préparer des flavonoïdes de référence (Lutéoline de Reseda Luteola L. , Apigénine de Petroselinum sativum Hoffm. , Acacétine de feuilles de Robinia pseudacacia L. , Saponarine de Saponaria officinalis L. , Lutonarine de Hordeum vulgare L.) , ont été récoltées en plein champ .

II - 2 - Préparation des échantillons .

Pour la préparation des composés de référence , les plantes entières sont simplement séchées à l'air et à l'obscurité puis conservées ainsi à température ambiante . Dans les autres cas , les feuilles provenant d'au moins six plantes différentes sont récoltées en début de photopériode et immédiatement placées à l'obscurité et au froid (dans un réfrigérateur à + 4°C environ).

II - 2 - 1 - Préparation d'échantillons de feuilles lyophilisées .

Les feuilles , stockées d'abord à + 4°C , sont congelées soit immédiatement par immersion dans de l'azote liquide , soit en quelques heures dans un congélateur à - 25°C . Elles sont ensuite broyées à la main et réparties en couche mince et non tassée , de 1 cm d'épaisseur environ , dans des boites de PETRI en pyrex (diamètre 14 cm) . Dans ces conditions , elles peuvent être lyophilisées pendant 24 heures , et sans qu'il y ait traces de décongélation , dans un lyophilisateur " MARTIN-CHRIST , gamma " Les échantillons ainsi préparés sont ensuite stockés à - 25°C dans des récipients de plastique étanches à l'humidité .

Avant analyse , ces récipients sont réchauffés sous jet d'air chaud , pour éviter toute condensation . Le matériel , environ 1 g , est ensuite broyé au moyen d'un broyeur à bielle DANGOUMEAU à la cadence de 700 coups/min. , dans un pot et avec des billes d'acier , pendant 30 secondes pour

le Melon et la Tomate ; le même broyage doit être répété 3 fois pour le Blé . Les dosages sont pratiqués sur des parties aliquotes de poudre préparée le jour même .

II - 2 - 2 - Préparation des chloroplastes .

Les chloroplastes sont isolés par centrifugation différentielle selon un protocole voisin de celui de ARNON et al. (1956) dans du tampon phosphate 0,15 M - pH 7,5 , saccharose 0,3 M contenant éventuellement du chlorure (0,15 M) et de l'ascorbate (0,005 M) de sodium ; la température étant comprise entre celle des bacs à glace fondante et celle du réfrigérateur . Les feuilles , refroidies sont d'abord broyées dans les pots de verre " MASSON JAR " de 500 ml , 150 ml de tampon pour 30 g de feuilles , pendant 3 fois 30 secondes , avec un broyeur à hélice " SORVALL , OMNI-MIXER " à la vitesse maximum (15 000 t/min. environ) . Le broyat est d'abord filtré sur quatre épaisseurs d'étamine ; les débris sont ensuite séparés du surnageant , contenant les chloroplastes , par centrifugation à 300 x g pendant 2 minutes . Les chloroplastes eux-mêmes , sont ensuite séparés du surnageant par une centrifugation de 7 minutes à 1000 x g . Le surnageant ainsi obtenu est conservé à l'obscurité au froid . Le culot chloroplastique est remis en suspension , délicatement , dans 100 ml de tampon avec une pipette , puis , les chloroplastes lavés sont isolés après une dernière centrifugation (1000 x g , 8 minutes) .

Les culots chloroplastiques sont congelés directement dans les godets de centrifugeuse comme le sont les feuilles ; ils sont lyophilisés puis conservés à - 25°C et à l'obscurité .

II - 2 - 3 - Préparation des poudres acétoniques .

Les poudres acétoniques de feuilles sont obtenues selon un protocole analogue à celui proposé par NEISH (1961) ; la préparation a été faite dans les pots de verre de 2 litres " MASSON-JAR " du broyeur à hélice " SORVALL " maintenus à - 20°C . Les feuilles refroidies (100 g) sont découpées aux ciseaux en morceaux d'environ 1 cm^2 , dispersées dans 750 ml d'acétone à - 20°C puis broyés à la vitesse maximale , 3 fois pendant 30 secondes avec chaque fois un arrêt de 30 secondes . On laisse se déposer le broyat pendant 30 minutes dans le pot maintenu à - 25°C dans un congélateur ; l'extrait acétonique étant éliminé , on disperse , à nouveau , le broyat dans 750 ml d'acétone à - 25°C . Ensuite , le broyat précipité est récupéré par filtration sur papier dans un large entonnoir Buchner en porcelaine , refroidi préalablement à + 4°C , tel que le broyat filtré forme une couche d'environ 1 cm . Le broyat peut ainsi être remis aisément en suspension ; il est ainsi lavé trois fois avec 300 ml d'acétone à - 25°C, puis essoré sur filtre . La poudre ainsi obtenue est séchée tout d'abord

à l'air pendant une heure environ sous une légère ventilation ; l'acétone restante est éliminée ensuite dans un exciccateur sous vide (10 torr) en présence d'anhydride phosphorique pendant 24 h. La poudre acétonique ainsi obtenue a été ensuite conservée à - 25°C comme les chloroplastes lyophilisés .

II - 3 - Extraction des polyphénols .

Les polyphénols sont obtenus de façon préparative au moyen d'un extracteur de SOXHLET et de façon analytique par extraction sur colonne . Dans tous les cas , on utilise une séquence de solvants de polarité croissante ; on emploie des solvants de qualité "RP" PROLABO qui sont toujours redistillés . En particulier l'éther éthylique est redistillé sous vide (100 torr) en présence de sulfate ferreux (5g/litre environ) . L'éther de pétrole et le pentane sont purifiés par trois traitements à l'acide sulfurique (agitation pendant 12 h. à raison de 100 ml de H_2SO_4/ litre suivie de lavages à l'eau jusqu'à neutralité) puis distillés sur potasse . Les autres produits ou réactifs utilisés sont les plus purs trouvés dans le commerce ; l'eau est simplement désionisée .

II - 3 - 1 - Extraction préparative (Extracteur SOXHLET) .

L'extraction est pratiquée sur 10 g de feuilles lyophilisées , broyées , dispersées dans environ 75 ml de sable lavé aux acides puis placées dans la cartouche en cellulose de l'extracteur . La séquence des extractions successives est la suivante :

- 1 - extraction avec un mélange éther de pétrole (40-60°C) à 2% de méthanol , le mélange (500 ml) est renouvelé au bout de 3 heures ; 6 heures suffisent en général pour que les pigments liposolubles , chlorophylles et caroténoïdes , soient extraits en presque totalité ;

- 2 - extraction par de l'éther éthylique : l'extraction est pratiquée durant une nuit dans un volume total de 500 ml qui permet l'extraction des pigments liposolubles ;

- 3 - extraction par du méthanol : le solvant (500 ml) est renouvelé au bout de 2 heures ; 4 heures suffisent , en général , pour que le méthanol d'extraction reste incolore : les polyphénols ainsi isolés constituent la fraction Me ;

- 4 - extraction par de l'eau : elle est faite de la même façon que la précédente ; 4 à 6 heures suffisent pour que l'extrait soit incolore : les polyphénols isolés ainsi constituent la fraction Aq. .

Les fractions Aq et Me sont ensuite concentrées sous vide dans un évaporateur rotatif . L'extrait méthanolique est concentré et le résidu

sec lavé deux fois , par environ 250 ml d'éther éthylique pour éliminer les pigments liposolubles restant ; les polyphénols restés sur le ballon sont ensuite repris dans un volume de méthanol ajusté à 20 ml . L'extrait aqueux est concentré de la même façon , mais après addition de n-butanol (0,9 vol-1 vol d'extrait) ce qui a pour effet de faciliter l'évaporation de l'eau par formation d'un azéotrope ; le résidu sec est repris par le minimum d'eau et dilué volume à volume par du méthanol jusqu'à 20 ml . Les extraits ainsi concentrés sont conservés au froid .

II - 3 - 2 - Extraction progressive discontinue .

L'échantillon lyophilisé (0,1 à 1 g au maximum) est homogénéisé très finement dans un mortier , par fractions successives avec 25 ml de sable lavé . Les 25 ml de sable sont ensuite versés dans une colonne à chromatographie munie d'un robinet de téflon , au bas de laquelle , est placée une quantité de coton de verre juste suffisante pour retenir le sable . Pour éviter une remise en suspension de la poudre par les solvants on ajoute en haut de la colonne déja chargée 5 ml de sable . L'extraction est faite à débit constant , en général 10 ml/min , et sous une hauteur de liquide que l'on peut maintenir automatiquement constante à l'aide du dispositif sur la figure 2 ; on peut ainsi réaliser simultanément jusqu'à six extractions . La séquence des extractions successives en général réalisée est la suivante :

- 1 - Pentane (ou éther de pétrole) à 2% méthanol ;
- 2 - Ether éthylique ;
- 3 - Méthanol ;
- 4 - Eau .

Les extractions sont faites sous faible éclairement ; les extraits sont toujours conservés à l'obscurité et au froid dans des fioles rodées , inactiniques absorbant tout rayonnement de longueur d'onde inférieure à 550 nm .

II - 3 - 3 - Extraction analytique par gradient .

L'extraction est réalisée au moyen d'une pompe à gradient ISCO " 380 DIALAGRAD " qui permet de réaliser à l'aide de deux pompes des mélanges de solvants tout en maintenant un débit choisi constant . L'échantillon lyophilisé (quelques milligrammes) dispersé comme précédemment dans du sable est placé dans une seringue de 2 ml portant à ses deux extrémités des aiguilles hypodermiques qui permettent de la relier au moyen de tubes de téflon (diamètre intérieur = 1 mm) à la pompe à gradient d'une part , et , à une cuve à circulation de 1 cm de trajet optique placée dans un spectrophotomètre " BECKMAN DK 2A " d'autre part . Le spectrophotomètre est utilisé à longueur d'onde fixe pour enregistrer en fonction du temps

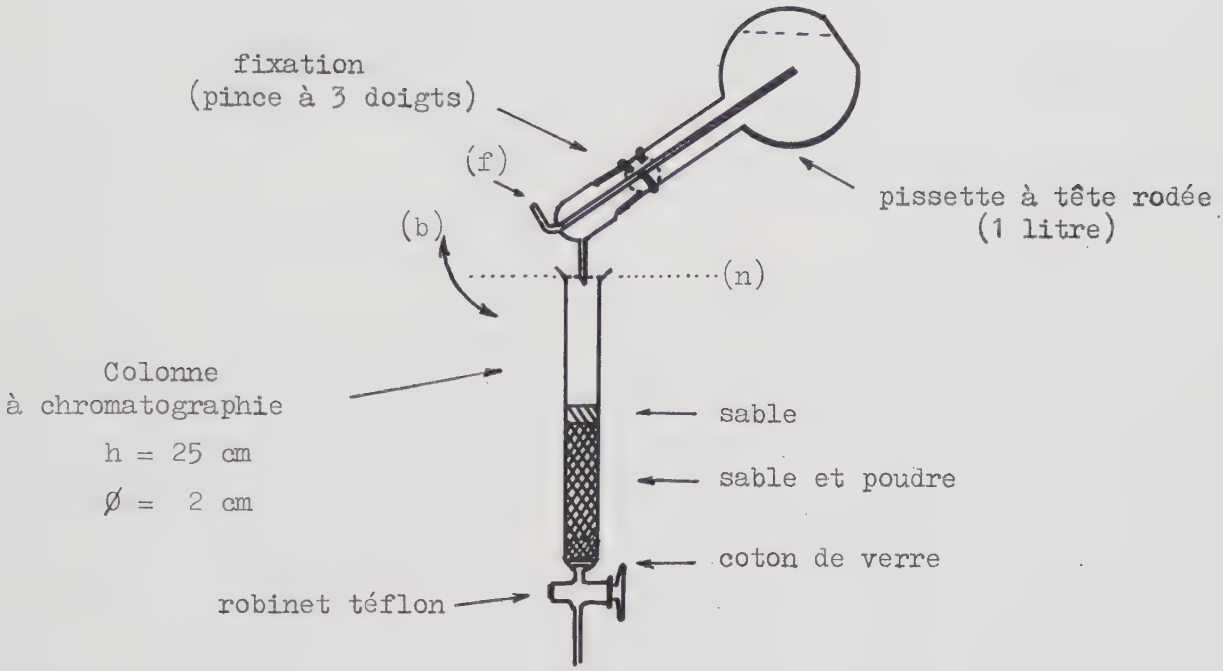


Figure 2 - DISPOSITIF D'EXTRACTION PROGRESSIVE A NIVEAU CONSTANT SUR COLONNE .

Le système de fixation (pince à 3 doigts) permet le basculement de la pissette selon les flèches (b) . L'un des conduits d'écoulement de la pissette est scellé(f), le niveau (n) du biseau du second conduit , détermine le niveau du solvant . Lorsque le solvant s'écoule, la baisse du niveau permet une entrée d'air par le biseau du second conduit et la sortie d'un volume équivalent de solvant qui rétablit ainsi le liquide à son niveau initial (n) .

la variation de la densité optique des pigments extraits ; la mesure est faite par référence à une cuve remplie de méthanol . La première extraction est faite à l'aide d'un gradient linéaire de méthanol dans l'éther de pétrole . La pompe utilisée pour l'éther de pétrole est ensuite purgée à l'aide de méthanol puis d'eau . Une valve à 3 voies " PHARMACIA LV 3 " est placée entre la pompe et la seringue , afin de réaliser ces manipulations sans provoquer d'entrée d'air dans le circuit de mesure . Malgré toutes les précautions prises , la formation de bulles , par cavitation lors du pompage des solvants volatils , est très difficile à éviter . La seconde extraction est faite ensuite , par un gradient d'eau dans le méthanol , sans autre modification du système .

II - 3 - 4 - Reconstitution des échantillons et extraction progressive des polyphénols .

Afin de pouvoir reconstituer les échantillons de feuilles et de chloroplastes par readdition de polyphénols isolés sous forme de fractions Aq ou Me , les poudres sont traitées , sans dispersion dans le sable , dans une colonne chromatographique démontable . Les pigments sont extraits selon la séquence ordinaire puis la colonne est lavée par 100 ml de méthanol , pour éliminer l'eau , puis par 100 ml d'éther éthylique , pour chasser le méthanol ; le résidu extrait est récupéré par extrusion , dispersé puis séché sous vide dans un dessiccateur. Des parties-aliquotes de poudre sont ensuite , réparties dans des godets coniques et dispersées dans les solutions concentrées de polyphénols , au maximum : 1 ml de fraction Aq ou Me , concentrée dix fois , pour 20 mg de poudre , en général . Une dessiccation préliminaire est réalisée à température ambiante , en présence de P_2O_5 , pendant 2 à 3 heures sous un vide d'environ 10 torr , on obtient ainsi une pâte visqueuse qui peut , alors , être désséchée pendant 2 heures sous un vide plus poussé de 1 torr . La poudre sèche , obtenue finalement , est ensuite lyophilisée , réduite en poudre avec la pointe d'une spatule , pesée et stockée éventuellement à - 25°C . Pour mesurer le rendement d'incorporation dans la poudre , les godets sont lavés par 20 ml d'une solution 10^{-3} N de HCl dans l'eau ; après dilution correspondante des extraits utilisés pour la reconstitution , les polyphénols sonr dosés par spectrophotométrie de différence (paragraphe II - 6 - 1 ; figure 4) après un cycle alcalinisation-acidification . Les poudres reconstituées sont traitées après broyage et dispersion sur sable selon le protocole précédent , mais en réduisant les volumes d'extraction proportionnellement à la masse des échantillons . Les dosages sont faits ensuite directement , par spectrophotométrie de différence , sur les extraits ainsi obtenus .

II - 3 - 5 - Extraction des flavones de référence (lutéoline , apigénine , acacétine) .

La préparation est faite à partir de l'extrait méthanolique (paragraphe II - 3 - 1) de feuilles de Robinier (acacétine , apigénine) , de tiges et feuilles de Réséda (lutéoline , apigénine) et de Persil (apigénine) selon une technique voisine de celle de THOMAS (1906) . L'extrait méthanolique concentré à sec est repris par un minimum d'eau bouillante ; la solution est ensuite refroidié (+4°C) quelques heures . Le dépot gélatineux jaunâtre , repris dans 50 ml d'eau est dilué par 50 ml d'éthanol et 40 ml d'acide chlorhydrique pur , est hydrolysé sous reflux pendant 3 heures sous azote . L'hydrolysat , préalablement saturé par du chlorure de sodium , est traité par 3 volumes d'éther éthylique . L'extrait éthéré est ensuite lavé par de la soude 10^{-4}N qui est récupérée rapidement , et immédiatement , acidifiée par de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH : 1 environ Les flavones sont ensuite extraites à nouveau par de l'éther éthylique qui est enfin évaporé . Le résidu sec est alors repris dans quelques ml d'eau chaude , en ajoutant si nécessaire quelques gouttes de méthanol ; la solution obtenue est refroidie . Le dépot formé est ensuite repris , en suspension , dans un volume minimum d'eau , congelé et ensuite lyophilisé comme les feuilles et les chloroplastes . Les poudres ainsi obtenues sont conservées à - 25°C à l'obscurité .

II - 4 - Purification des polyphénols .

Pour purifier , puis identifier et doser les polyphénols , nous avons surtout utilisé la chromatographie sur papier , technique largement utilisée (SEIKEL , 1964) depuis qu'elle a été introduite par BATHE-SMITH (1948) dans le domaine des polyphénols .

Nous avons tenté de séparer sur colonne de Sephadex-LH 20 , les flavonoïdes des feuilles de Melon en utilisant la technique employée avec succès par JOHNSTON et al. (1968) pour la séparation de quercétosides ; il a été possible de reproduire les résultats de ces auteurs mais non de séparer les flavonosides du Melon confirmant ainsi l'intérêt souvent limité (PARIS, 1960) des séparations sur colonne dans le domaine des polyphénols . Au contraire nous avons cherché à utiliser le plus souvent les séparations sur couches minces qui ont été introduites plus récemment (PARIS , 1960) et qui présentent l'avantage d'être polyvalentes ; rapides , résolutives et utilisables tout autant à l'échelle analytique , sur des fractions de microgrammes , qu'à l'échelle préparative .

II - 4 - 1 - Séparation préparative par chromatographie sur papier .

Les séparations préparatives sont réalisées sur papier WHATMAN 3MM le plus souvent , avec comme solvant un mélange n-butanol-acide acétique-

eau : 100-27-73 (v/v) et , parfois , avec des solutions de 5 à 25% d'acide acétique dans l'eau . Dans tous les cas , l'atmosphère de la cuve est saturée des vapeurs du solvant . Les feuilles sont chargées , au moyen de p pipettes à écoulement total de 0,1 ml ; le dépot , en forme de trait , est séché au fur et à mesure sous un jet d'air . La charge optimum , déterminée par séparation de quantités croissantes déposées sur un trait de 5 cm , correspond , en général , à 0,4 ml du solvant sur toute la longueur de la feuille , des bandes de 1 cm de large environ . Le séchage des feuilles est réalisé dans une étuve ventilée , pendant 20 minutes à 70°C . Les flavonoïdes sont localisés par leur absorption caractéristique dans le proche ultraviolet (360 nm) et les bandes délimitées au crayon . Ces bandes sont ensuite découpées et réduites en fragments de 1 cm^2 environ . En général , 8 séparations sont réalisées simultanément et les fragments correspondant des 8 bandes homologues sont extraits trois fois par 500 ml de méthanol contenant 1% d'eau . L'extraction est ainsi totale et les extraits ainsi obtenus sont concentrés à sec puis repris dans 5 ml de méthanol et conservés à + 4°C .

II - 4 - 2 - Séparations préparatives sur couche de cellulose .

Les couches de cellulose sont réalisées sur plaque de verre 20 x 20 cm au moyen d'un étaleur DESAGA . Pour cela , on homogénéise 21 g de cellulose MN 300 dans 135 ml d'eau pendant 1 minute et à la vitesse maximale du broyeur " OMNIMIXEUR SORVAL " ; la pâte obtenue est étalée en couche de 0,75 mm d'épaisseur sur 4 plaques . Les plaques , séparées les unes des autres sur le gabarit , sont d'abord séchées à l'air environ 30 minutes puis à l'étuve ventilée , à 110°C ,pendant 1 h. . Après refroidissement , elles sont conservées simplement à l'abris de la poussière . Ces plaquess sont ensuite chargées au moyen d'une seringue HAMILTON équipée d'un " REPETING DISPENSER " qui permet , à l'aide d'une crémaillère , de déposer des gouttes dont le volume est égal au 1/50ème du volume de la seringue . En général on utilise une seringue de 25 µl qui permet de déposer , sous forme de trait régulier après trois passages successifs , des quantités de l'ordre de 2 à 5 µl/cm des solutions de flavonoïdes préalablement purifiées sur papier . Le développement a lieu dans des cuves rainurées permettant de réaliser simultanément cinq séparations , on place dans la cuve 150 ml de solvant qui , de plus , sert à saturer l'atmosphère . Après migration , les plaques sont placées le moins longtemps possible , pour le séchage , dans une étuve ventilée à 110°C . Comme précédemment , les bandes sont repérées ; la cellulose des cinq bandes homologues est ensuite grattée et éluée par 50 ml de méthanol ; l'extraction , faite dans un becher à l'aide d'un agitateur magnétique , est répétée trois fois . Les fractions réunis sont ensuite concentrées et conservées à l'obscurité et au froid .

II - 4 - 3 - Chromatographie analytique des polyphénols.

Ces séparations ont été réalisées parfois sur papier WHATMAN n°1, afin de comparer nos propres résultats aux données de la bibliographie, mais surtout sur couche mince. Dans tous les cas les dépots sont fait en forme de trait, d'au moins 1 cm, déposé en 3 à 5 fois à l'aide d'une seringue HAMILTON, technique qui a pour effet d'améliorer la résolution de séparations. Le silicagel G et le kieselgel G MERCK sont étalés à raison de 45 g homogénéisé dans 20 ml de méthanol. La polyamide MN a raison de 25 g de polyamide dans 80 ml de méthanol ; nous avons vérifié que l'addition de 5g de cellulose MN 300 à ce mélange a pour effet de rendre les plaques plus résistantes sans modifier le R_f des polyphénols séparés sur ces couches mixtes. Les autres opérations de préparations des plaques sont analogues à celles décrites précédemment (paragraphe III - 4 - 2); l'épaisseur des couches est seulement réduite à 0,25 mm ce qui permet de préparer 5 plaques à la fois. Bien souvent la séparation des polyphénols de structure voisine est difficile à réaliser parce que leurs R_F sont aussi en général très voisins : c'est en particulier le cas pour les flavonïdes du Melon et c'est la raison pour laquelle nous avons choisi la technique des développements répétés à une dimension pour les séparer. Cette méthode, pourtant très résolutive, n'est pourtant que rarement utilisée (RANDERATH, 1971) ; la séparation relative Δ_p après p développements de deux substances de R_F, respectivement r et r', est donné par la formule générale :

$$\Delta_p = (1 - r)^p - (1 - r')^p$$

que THOMA (1963) a exploité de façon automatique au moyen d'un calculateur. Pour choisir les conditions optimales de développement, nous avons calculé la distance D_p qui sépare deux taches après p migrations en fonction de la longueur de développement L, de la différence , de la somme S et du produit P des R_F . On a simplifié les expressions en tenant compte du fait que les R_F . On a simplifié les expressions en tenant compte du fait que les R_F étant voisins, S et P peuvent être exprimés en fonction de la moyenne m des R_F ; on a en effet :

$$S = 2\,m \text{ et } P \# r^2 \# rr' \# r'^2 \# m^2$$

Dans ces conditions on peut calculer directement

pour p = 1 : $D_1 = r\,L - r'L$ donc $\Delta_1 = \Delta$ avec $D_1 = \Delta_1 \cdot L$

pour p = 2 : $D_2 = r\,L + r\,(L - rL) - r'L + r'\,(L - r'L)$

d'où $D_2 = L.\ \Delta\ .\ (2 - S)$

et donc $\Delta_2 = \Delta\ .\ 2\ (1 - \frac{S}{2})$ avec $D_2 = \Delta_2 \cdot L$

pour p = 3 : on trouve, de la même façon, par différence des parcours :

$$\Delta_3 = \Delta . 3 \left(1 - \frac{S}{2} \right)^2 \quad \text{avec } D_3 = \Delta_3 . L$$

Au total, les valeurs successives trouvées pour Δ_p sont les termes de la progression géométrique de terme général :

$$\Delta_p = \Delta . p . \left(1 - \frac{S}{2} \right)^{p-1} \text{ avec } D_p = \Delta_p . L$$

En particulier l'amélioration apportée par la (p) ième migration par rapport à la (p - 1) ième est donnée par :

$$\frac{\Delta_p}{\Delta_{(p-1)}} = \frac{p}{p-1} \left(1 - \frac{S}{2} \right)$$

En conséquence, on prévoit que l'amélioration due aux migrations successive diminue lorsque p augmente ; de plus, elle n'est importante que si S est faible. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas utilisé plus de trois migrations successives sur couche mince de cellulose en solvant aqueux (acide acétique à 1 ou 5 %) pour séparer et doser les flavonosides du Melon.

II - 4 - 5 - Electrophorèse analytique des polyphénols.

Les séparations par électrophorèse sont faites dans une cellule CAMAG " selon PASTUSKA " équipée d'un bloc de refroidissement par circulation d'eau et d'une alimentation stabilisée 0 - 1200 V ; la technique de PASTUSKA et TRINKS (1961) a été précisée par WALKER et THOMSON (1969). On peut utiliser les couches préparatives décrites précédemment, cependant les plaques de cellulose " MERCK " prêtes pour l'emploi, permettent d'obtenir des résultats beaucoup plus reproductibles. Les dépôts sont d'abord faits sous forme de traits de 1 à 2 cm à la seringue HAMILTON. Le support est ensuite imprégné de tampon par application sur la plaque d'une feuille de tissu " MIRACLOTH-CALBIOCHEM" trempée préalablement dans le tampon choisi et appliquée sur la surface de cellulose à environ 1 cm du trait de départ. La même opération est réalisée rapidement des deux côtés du trait de façon à laisser diffuser le tampon symétriquement des deux côtés vers les dépôts. Ce mode opératoire , par imprégnation symétrique, permet d'obtenir aisément des résultats plus reproductibles que ceux obtenus en général par pulvérisation du tampon sur la plaque ; l'imprégnation peut être faite au moyen de papier WHATMAN 3 MM qui est cependant plus fragile. La plaque est essorée avec du papier "Joseph" et placée sur le bloc réfrigérant de la cellule ; le contact est établi avec les augettes au moyen de bandes de papier ou de tissu imprégnées de tampon et séparées de la plaque

par du tube à dialyse . Après séparation , les plaques sont séchées comme après une chromatographie sur couche mince .

II - 5 - Caractérisation des polyphénols .

Les polyphénols sont caractérisés , directement sur couches minces , après séparation chromatographique ou bien , après élution , par spectrophotométrie dans l'infrarouge (2,5 à 5 μ) et dans l'ultraviolet à partir de 250 nm .

II - 5 - 1 - Caractérisation des polyphénols sur couche mince .

Pour localiser et identifier les polyphénols sur couche mince , on utilise le protocole maintenant classique proposé par BATHE-SMITH (1948) et qui a été complété , entre autres , par SMITH (1960) . Les protocoles de révélation des taches sont décrits par ces auteurs , ainsi que dans une brochure MERCK (1965) . On utilise une lampe " CAMAG TL 900 U " équipée de tubes fluorescents qui émettent dans le proche ultraviolet (tubes GE BLB , 360 nm) et dans l'ultraviolet moyen (tube Germicide , 254 nm) . On note successivement les couleurs des taches sous lumière blanche , puis sous ultraviolet proche , puis moyen , chaque fois avant et après exposition à des vapeurs d'ammoniaque .

En plus des réactifs classiques au permanganate de potassium , au nitrate d'argent , à la solution cupro-alcaline , aux sels ferriques dont les protocoles de fabrication sont décrits dans les 3 références citées plus haut , on a surtout utilisé deux réactifs plus rarement utilisés , proposés par GIBBS (1927) et par NEU (1958) .

II - 5 - 1 - 1 - Révélation des C-glycosylflavones par le réactif de GIBBS : 2,6-dichloro-p-benzoquinone-4-chloroimide .

La réaction , en milieu alcalin , du réactif de GIBBS avec les carbones aromatiques non substitués situés en para de fonctions phénol libres donne des indophénols bleus . La réaction n'est pas spécifique , au moins en solution (DACRE , 1971) , mais , d'après HOROWITZ et GENTILI (1964) et nous le confirmons , elle permet de distinguer les 6-C-glycosylflavones qui réagissent par leur carbone 8 des 8-C-glycosylflavones qui ne peuvent réagir par leur carbone 6 ; c'est le cas pour l'isovitexine et la vitexine respectivement (tableau 1B) . Dans la série de la lutéoline (tableau 1B) l'isoorientine réagit nettement , mais l'orientine donne une faible réaction couleur grise , due vraisemblablement à la réaction du carbone 6' du cycle B . Pour révéler une chromatoplaque , on sature d'abord la couche par des vapeurs d'ammoniaque , ensuite on pulvérise 20 ml de solution à 1% du réactif dans du méthanol ; après séchage enfin , on expose à nouveau à des vapeurs d'ammoniaque : les couleurs apparaissent immédiatement .

II - 5 - 1 - 2 - Révélation des flavones par le réactif de NEU.

Les flavonosides réagissent avec le diphénylborate d'amino-2-éthyle (réactif de NEU "FLUKA"), en solution, pour former des complexes colorés jaunes. Ce réactif peut être utilisé sur chromatograme pour révéler les flavones ; il donne alors des colorations analogues à celles obtenues avec le chlorure d'aluminium, que l'on peut contraster par addition au réactif d'un ammonium quaternaire (NEU, 1956). Nous avons constaté que l'exposition sous ultraviolet proche des plaques révélées par le réactif de NEU seul, permet de contraster aussi les révélations; les flavones de type apigénine (figure 1A : vitexine, isovitexine, saponarine) prennent ainsi une couleur rouge à brun rouge, alors que leurs homologues de la série de la lutéoline restent jaune vif. Pour révéler une chromatoplaque, on pulvérise donc 20 ml d'une solution de réactif à 2 % dans le méthanol, on sèche à l'étuve puis on note les couleurs révélées sous lumière visible et sous ultraviolet avant et après 3 heures d'exposition sous ultraviolet, la plaque étant placée à quelques centimètres du filtre de la lanpe CAMAG déja décrite.

II - 5 - 2 - Caractérisation par spectroscopie dans l'ultraviolet.

La caractérisation est faite sur les solutions méthanoliques de polyphénols purifiés ; le protocole employé est voisin de celui de MABRY et al. (1970). Les mesures sont faites dans des cuves de 1 cm de trajet optique sur 2,5 ml de solution et parfois 0,5 ml, avec un spectrophotomètre enregistreur UK 2A possédant une échelle logarithmique des longueurs d'onde.

Pour chaque composé, on enregistre successivement six spectres correspondant à six réactions différentes, toujours sur la même feuille de papier enregistreur ; la comparaison de la position et des hauteurs relatives des pics permet d'établir le "standard spectroscopique" du composé. Les résultats obtenus sont comparables à ceux de MABRY et al. (1 0). On utilise donc une solution de base (SB) du composé dans le méthanol et la mesure est faite par référence à la solution homologue contenant les mêmes quantités de réactif, exception faite du composé étudié. On enregistre donc, les spectres des solutions suivantes :

- 1 - 0,5 ml de SB dilué par 0,15 ml de méthanol pur ;

- 2 - 0,5 ml de SB dilué par 0;15 ml de méthanol à 1% de méthylate de sodium " MERCK" conservé au froid dans un dessiccateur ;

- 3 - 0,5 ml de SB dilué par 0,15 ml de méthanol à 1% (p/v) de trichlorure d'aluminium "MERCK". La solution de réactif est préparée avec précaution en agitant vivement 100 ml de méthanol dans lesquels on verse

le réactif préalablement réduit en poudre; l'utilisation de ce réactif, plus dilué que celui proposé par MABRY et al. (1970), permet de suivre la formation des complexes flavono-aluminiques et de les caractériser ainsi, plus précisément, à l'aide des points isobestiques (MONTIES et DOUILLARD, 1969) ;

- 3 - 0,65 ml de la solution précédente, dans laquelle la réaction est terminée, diluée par 0,15 ml de HCl (D = 1,16) à 1 % (v/v) dans du méthanol ;

- 4 - 0,5 ml de SB saturé par de l'acétate de sodium; l'acétate de sodium " RP PROLABO " est préalablement fondu dans une coupelle en platine de façon à éliminer l'acide acétique résiduel, puis broyé finement au mortier et conservé à l'abri de l'humidité . Lors de l'essai on dissout l'acétate par apports successifs jusqu'à saturation, par agitation violente dans la cuve hermétiquement bouchée ;

- 5 - 0,5 ml de SB, déjà saturé par de l'acétate de sodium, sont saturés, de la même manière, mais cette fois par de l'acide borique "RP PROLABO". Lors des deux dernières mesures, la dispersion des cristaux de sel sur les parois de la cuve est en général différente dans les cuves . Pour pouvoir comparer les hauteurs des pics au moins de façon semi-quantitative il faut remettre le tout en suspension et vérifier que la forme du spectre ne varie pas après ce traitement. Au total, selon le protocole standard, la consommation de SB minimum est de 1,5 ml.

II - 5 - 3 - Caractérisation par spectroscopie dans l'infrarouge.

. La caractérisation a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre BECKMAN IR 33, l'échelle linéaire étant étalonnée au moyen d'un film de polyéthylène. La caractérisation des composés et des produits de référence a été faite dans des pastilles de bromure de potassium contenant environ 1 mg de composé. Dans tous les essais, le protocole de fabrication des pastilles a été le même. Le composé est apporté en solution dans 1 ml de méthanol, 5 à 6 gouttes sont dispersées avec environ 300 mg de KBr dans un mortier en agate; le méthanol est éliminé par évaporation dans un dessiccateur pendant 10 minutes sous 10 torr . L'opération est répétée jusqu'à épuisement de la solution. La poudre sèche est ensuite transformée en pastille à l'aide d'une presse " BECKMAN RIIC type 00-25", la montée en pression est faite, par palier, pendant 30 secondes tous les 50 Kg/mm^2 jusqu'à 260 Kg/mm^2 pendant 5 minutes sous vide de 1 torr environ. Le spectre est enregistré immédiatement après le démoulage de la pastille.

Les spectres sont enregistrés par rapport à l'air, on a vérifié qu'une pastille faite avec 1 ml de méthanol pur est optiquement vide.

II - 5 - 4 - Hydrolyses.

Après caractérisation spectroscopique, les polyphénols sont hydrolysés par voie acide, alcaline ou enzymatique.

II - 5 - 4 - 1 - Hydrolyse acide

Compte-tenu de la faible solubilité des flavones dans l'eau, même à chaud, on utilise des milieux d'hydrolyse hydro-alcooliques; le protocole est voisin de celui de HARBORNE (1965) . L'hydrolyse est faite dans des tubes à essai "QUICKFIT 24-2" dont les dimensions permettent des prélèvements directs dans l'hydrolysat à l'aide de la seringue "HAMILTON RD" et qui peuvent être bouchés hermétiquement grâce à un lourd bouchon rôdé, enduit de silicone. L'hydrolyse a lieu dans un bain de sable installé dans une étuve à 90°C. : en général, 0,1 ml d'un mélange eau (1 vol.) - éthanol (1 vol.) HCl pur (0,4 vol.). Pour analyse, on prélève à la seringue 25 µl d'hydrolyse est réalisé sous reflux dans des volumes de 24 ml; un barbotage d'azote "AIR LIQUIDE U" est alors réalisé pour dégazer le solvant, puis maintenu pendant toute la durée de l'hydrolyse. Après hydrolyse préparative, les polyphénols sont extraits par de l'éther ou du n-butanol. Les extraits sont éventuellement lavés par une solution alcaline comme précédemment (paragraphe II - 3 - 4).

II - 5 - 4 - 2 - Hydrolyse alcaline

Les hydrolyses alcalines sont toujours pratiquées à 0°C, dans des bacs à glace fondante et sous intense barbotage d'azote. Comme précédemment , une partie aliquote d'extrait méthanolique est évaporée à sec dans un tube QUICKFIT qui est ensuite placé dans le bac à glace. Le solvant d'hydrolyse étant dégazé, 0,2 ml de soude N est alors ajouté; la réaction est arrêtée par addition d'une quantité suffisante d'HCl. Le barbotage d'azote est alors supprimé et les produits d'hydrolyse, éventuellement, extraits comme précédemment.

II - 5 - 4 - 3 - Hydrolyse enzymatique

Les hydrolyses enzymatiques sont pratiquées dans des tampons 0,1 M à 35°C en général et à l'obscurité; dans tous les cas on suit le protocole d'essai établi par les fabricants (WORTHINGTON, MILES - SERAVAC, SIGMA). Les préparations d'enzyme dites "pectolytiques" et qui contiennent des mélanges d'estérase, d'hémicellulase, de glycosidase (RAPIDASE C 100, HAZYME de la Société " LA RAPIDASE" Seclin, 59 France) sont utilisées

dans du tampon acétate 0,1 M - pH 4,6 à 50°C et, à raison de 200 mg pour 2 ml de RAPIDASE C 100 ou de 0,2 ml pour 1,8 ml de HAZYME. Il est préférable de ne pas utiliser avec ces solutions, parfois très visqueuses, de seringue à piston.

II - 5 - 4 - 4 Identification des oses libérés par hydrolyse.

L'identification des oses est faite par chromatographie sur couche mince sur des parties aliquotes d'hydrolysat acide ou enzymatique. Les protocoles de séparation sont ceux de SCHWEIGER (1962) sur cellulose MN 300, de MARAIS (1967) sur polyamide et de TALUDKER (1971) sur kieselguhr G. Les couches minces ont été préparées selon les protocoles déja décrits (paragraphe II - 4 - 3) ; en particulier, les plaques de kieselguhr G sont préparées à partir de 30 g de poudre dispersés dans 75 ml de solution à 2,4 % de phosphate disodique puis, sans autres précautions, séchées à 110°C pendant 30 minutes et conservées à température ambiante. Pour séparer nettement les sucres, on réalise au moins deux migrations successives. Pour avoir des séparations correctes, notamment sur kieselguhr , il est nécessaire d'éliminer l'acide ajouté pour hydrolyse ; pour cela on utilise la technique de SMITH et PAGE (1948). On évapore d'abord, sous vide, l'éthanol contenu dans les 0,5 ml d'hydrolysat acide standard, on dilue ensuite à 1ml le résidu par de l'eau, puis, on le traite trois fois par 9 ml d'une solution de di-n-octylméthylamine " MERCK" à 10 % dans du chloroforme, en agitant violemment le tube à l'aide d'un " WHIL MIXER ". On vérifie enfin, au papier pH, que tout l'acide est éliminé et, on utilise pour chromatographie, une partie aliquote de la phase aqueuse ainsi neutralisée à pH = 7,0 .

II - 5 - 5 - Dosage des polyphénols

Les polyphénols sont dosés en solution par spectrophotométrie ou après séparation chromatographique, par réflectométrie, dans l'ultraviolet, sur couche mince. Comme les propriétés spectroscopiques et chromatographiques des flavonosides sont en général très voisines, on utilise comme substance de référence, dans ces deux types de dosage, de la rutine " FLUKA puris.". Tous les calculs sont faits sur la base d'une masse moléculaire MM = 610 et d'un coefficient d'absorption molaire $\mathcal{E}$ à 360 nm, $\mathcal{E}$ = 19 100 soit log $\mathcal{E}$ = 4,28 (GEISSMAN, 1958). D'après WAGNER et al. (1967) puis CARLIN et Mc CLURE (1973), les valeurs de log$\mathcal{E}$ dans la série des C-glycosylflavones (tableau 1 B) sont les suivantes :

vitexine (4,20), isovitexine (4,15), orientine (4,26), saponarine ou 7-O-glycosido-isovetexine (4,24), lutonarine ou 7-O-glucosido-isoorientine (4,27).

II - 6 - 1 - Dosage spectrophotométrique en solution

Le dosage est toujours réalisé après enregistrement du spectre ultraviolet de la solution, à partir de 250 nm; la densité optique étant mesurée maximum de plus grande longueur d'onde. Le dosage est ainsi fait, de façon quantitative, sur des solutions pures ou, compte-tenu des propriétés spectrales voisines des flavonoïdes, de façon semi-quantitative sur les extraits tels que la fraction Me, lavée à l'éther, ou la fraction Aq. Pour pallier les interférences avec les autres pigments, il est possible de doser les polyphénols par différence, après et avant, formation de complexes avec l'aluminium (MONTIES et al., 1969). Le même but peut être atteint par ionisation des polyphénols; la réaction est faite en solution aqueuse ou méthanolique et elle présente, de plus, l'avantage d'être totalement réversible.

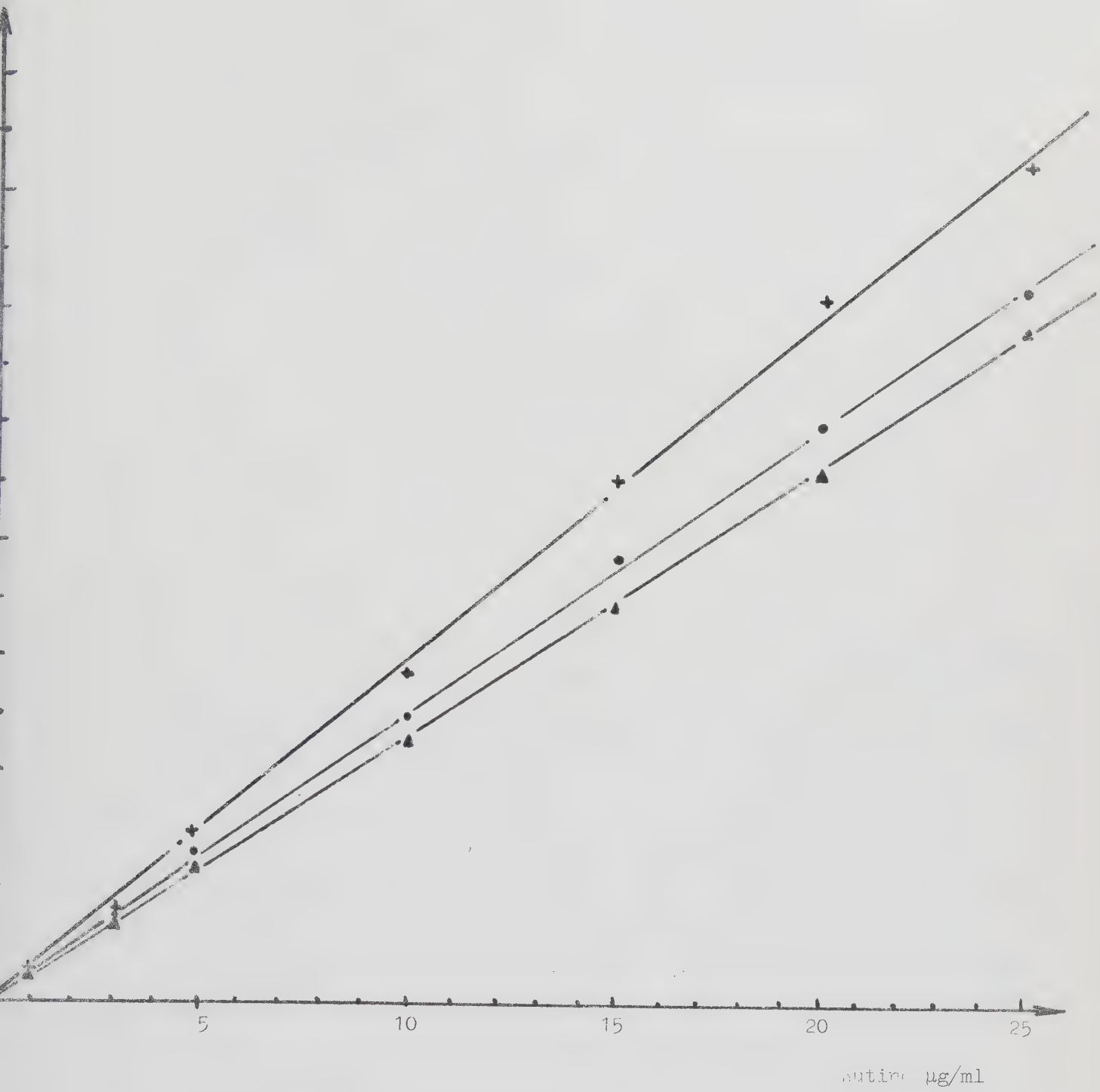
Le protocole est le suivant : on enregistre le spectre d'absorption entre 300 et 500 nm de la solution sur 2,5 ml de liquide, on provoque l'ionisation par addition de 1 goutte de soude N et l'on enregistre immédiatement le spectre. On rétrograde ensuite rapidement l'ionisation par addition de 1 goutte de HCl 6 N, et l'on enregistre enfin le spectre d'absorption pour vérifier la réversibilité des réactions. L'étalonnage est fait par rapport à une gamme de rutine (figure 3) la détection et le dosage sont possibles jusqu'à 0,005 de densité optique. Le même résultat est obtenu avec l'acide chlorogénique ou avec des mélanges de flavones, en rutine selon la coube d'étalonnage (figure 3).

II - 6 - 2 - Dosage réflectométrique sur couche mince

Après séparation chromatographique et élution, les polyphénols sont dosés par spectrophotométrie; le rendement de récupération est en moyenne de 90 $\pm$ 10 %; mais les opérations sont longues et délicates lorsque des quantités de l'ordre du microgramme sont isolées. C'est la raison pour laquelle on utilise, dans ce cas, la réflectométrie dans l'ultraviolet des polyphénols séparés sur couche mince.

On utilise un densitomètre "VITATRON TLD 100 à spot volant" dont le fonctionnement (SCHUTE et al., 1970) et l'utilisation pour le dosage réflectométrique des polyphénols (MONTIES, 1973) ont été décrits par ailleurs. Le protocole est le suivant.

Les charges, 10 par plaque au maximum, sont déposées sous forme de trait de 0,8 cm de long séparés chacun par 1 cm; elles contiennent environ 1 μ g de substance à doser par tache : cette charge optimale est déter-



igure 3 - DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE LA RUTINE EN SOLUTION AQUEUSE
TRAITEMENT - APRES ALCALINISATION ET REACIDIFICATION

● = Rutine solution aqueuse 10^{-3} N HCl (D 350 nm),

✚ = après alcalinisation (1 goutte NaOH N) (D 400 nm)

▲ = après alcalinisation et réacidification (1 goutte HCl 6 N)

(La détection et le dosage par cycle alcalinisation - acidification est possible jusqu'à D = 0,005 , même avec des solutions complexes)

minée en comparant visuellement des taches contenant 1 µg de composé de référence à une gamme de taches de la solution X à analyser . Pour le dosage on dépose au moins deux taches pour analyse , deux à quatre taches pour référence et deux à quatre taches pour chromatographie . Si l'on appelle R la solution de référence à 0,1 µg/µl , on dépose donc , par exemple, à partir d'un des côtés de la plaque les charges suivantes à l'aide d'une seringue HAMILTON de 25 µl :

10 µl R , 5 µl R , 10 µl X , 10 µl X + 5 µl R , 10 µl X + 5 µl R , 20 µl X , 10 µl X + 10 µl R , 10 µl X , 20 µl R , 10 µl R .

La plaque est développée à l'obscurité , puis séchée le plus brièvement possible , dans l'étuve ventilée . La lecture réflectométrique est faite immédiatement après et , en général , au maximum d'amplification de la réponse de l'appareil ; la réponse à la présence d'une tache se traduit ainsi par l'apparition d'un pic dont la surface est maximale (figure 4) . La surface des pics est mesurée par pesée après découpage d'un calque en papier " CANSON A 4 , 90-95g/m^2 " . Nous avons montré qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme de cette surface S et la quantité totale Q , ou charge , du composé dans la tache (MONTIES , 1973) , on a :

$$\log S = a \log Q + b .$$

Il en résulte une relation linéaire entre S et Q en coordonnées bilogarithmiques (figure 4) . Les conditions d'utilisation du densitomètre sont précisées sur la figure 4 ; l'emploi de filtres analyseurs permet d'accroître nettement la sensibilité . Le dosage est fait par interpolation sur des échelles linéaires et dans une gamme étroite de charge des taches (figure 4 , cartouche) . Le lavage des plaques , par trois migrations successives d'acide acétique à 30% dans le méthanol , ainsi que la qualité commerciale de la cellulose , sont pratiquement sans effet sur les résultats . Les chromatogrammes peuvent être " lus " plusieurs fois ou conservés plusieurs jours à l'obscurité , sans autre précaution , sans que les résultats soient modifiés .

II - 7 - Mesure des activités enzymatiques .

Les mesures sont faites sur des extraits de poudre acétonique ou directement sur les suspensions de chloroplastes ou sur les surnageants de centrifugation (paragraphe II - 2 - 2) purifiés par filtration sur gel . Dans tous les cas , on utilise du tampon phosphate 0,1 M , pH 7,5 qui est ajusté , lors des essais , avec de l'acide chlorhydrique ou de la soude N .

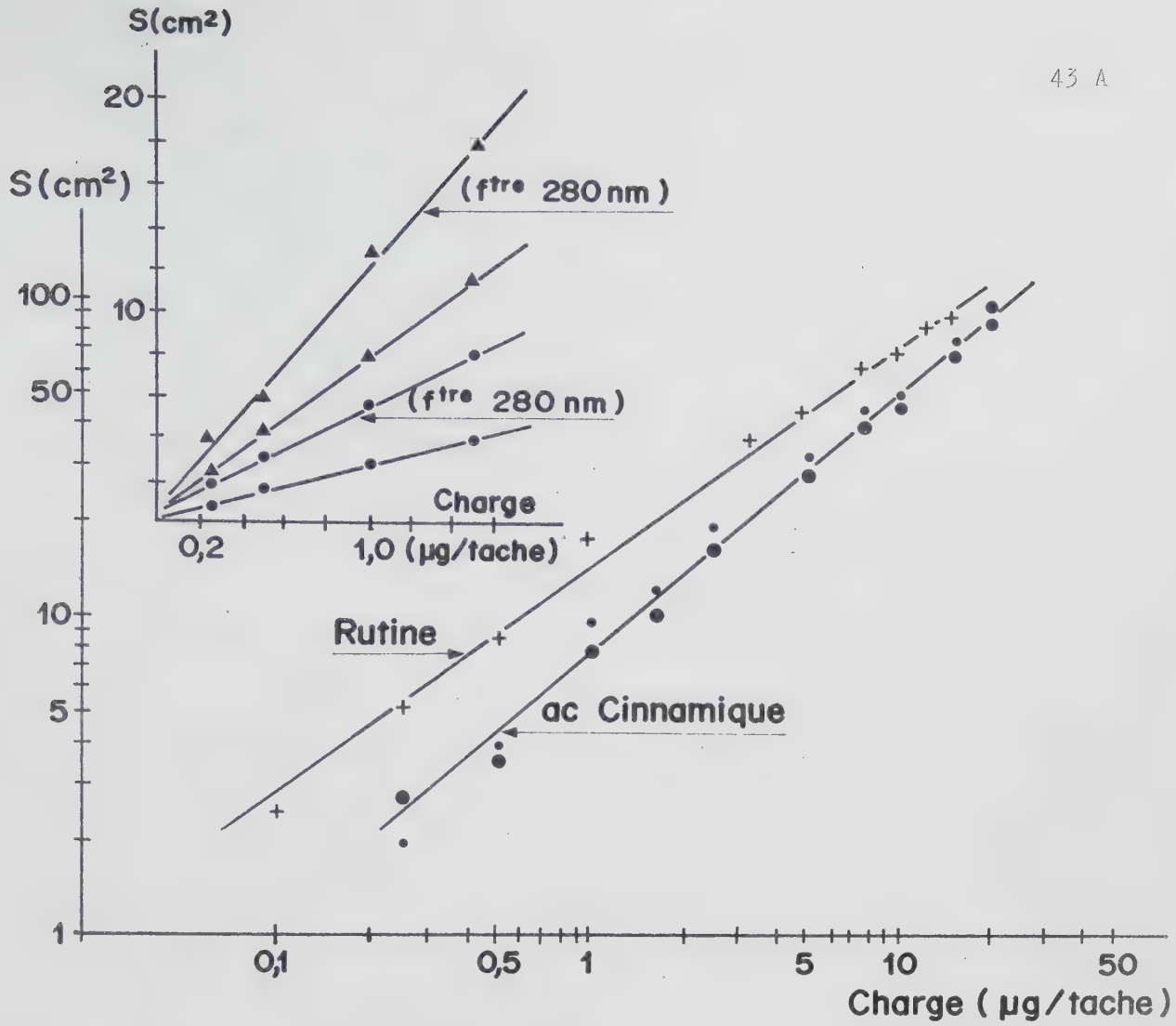


figure principale : dosage dans une gamme large , échelle bilogarithmique .
cartouche : effet de l'addition d'un filtre analyseur (280 nm) et de l'amplification (span : moyen ● ou fort ▲) sur le dosage de l'acide cinnamique , échelle linéaire .

Conditions de mesure - Mode lin-I enregistrement 3cm/cm plaque .
Source UV = HANAU ST 41 Hg détecteur = P.M Philips UVP 150 .

filtre incident = liquide UVB ($\lambda_{max.}$ 316 nm , λ 50%$_{max.}$ = 298 et 335 nm)
filtre analyse = interférentiel , $\lambda_{max.}$ 280 nm (ac. cinnamique) , 358 nm (rutine)

Autres réglages	Zéro C	level	span	damp
Rutine	7	f	7,7 (moy.)	2
Ac. cinnamique	6	a	10,0 (max.)	2

ero C = tension de fonctionnement (ajustement du zéro) Span = gain sur la réponse
evel = résistance de sortie Damp = modulation de la répons

Figure 4 - COURBE DE DOSAGE DE LA RUTINE ET DE L'ACIDE CINNAMIQUE PAR REFLECTOMETRIE SUR COUCHE MINCE DE CELLULOSE MN 300 A L'AIDE DU VITATRON TLD 100 .

II- 7 - 1 - Purification des surnageants par filtration sur gel.

La technique utilisée est voisine de celle de MINAMIKAWA et URITANI (1965). Le "SEPHADEX G 25 M" est mis à gonfler à + 4°C pendant 24 h. à raison de 20 g pour 200 ml de tampon saturé par du chloroforme. Ce gel, remis en suspension, en versé d'un coup dans une colonne à chromatographie ordinaire de 3 cm de diamètre (figure 2); on obtient ainsi une colonne d'environ 100 ml de gel gonflé. La qualité de la colonne est vérifié par passage de 1 ml de solution à 0,1 % de "BLUE DEXTRAN 2000" dans du tampon contenant environ 10 % de saccharose. La solution est déposée sous éluant, avec une seringue, alors que l'écoulement est arrêté; du fait de sa densité plus élevée que celle du tampon, la solution se dépose uniformément sur le haut du gel, et ainsi elle pénètre très uniformément dans la colonne lorsque l'écoulement est rétabli. Le volume mort (VM) est d'environ 45 ml.

Lors de la purification des protéines du surnageant, on dépose de la même manière 15 ml de surnageant brut sur le haut de la colonne ; l'élution est faite sous une pression constante de 20 cm de tampon établie à l'aide d'un vase de Mariotte. Dans ces conditions, au moment où tout le volume mort s'est écoulé, la colonne présente trois zones colorées : en bas, une zone verte contenant les flavonoïdes et les polyphénols ; entre les deux, une zone opalescente blanchâtre. L'existence de cette zone est l'indice d'une séparation correcte. On récupère alors 30 ml de surnageant purifié; les pigments polyphéniques ne sont élués ensuite qu'entre 150 et 500 ml environ. La colonne est ensuite lavée par passage de 2 l de tampon puis conservée toujours à + 4°C, après saturation en chloroforme.

II - 7 - 2 - Mesure de l'activité PAL

L'activité PAL est dosée par spectrophotométrie à 290 nm lorsque l'enzyme est extraite de poudres acétoniques, le protocole est voisin de celui de KOUKOL et CONN (1961) ou bien, par réflectométrie sur couche mince (paragraphe II - 6 - 2), parès purification de l'acide cinnamique formé.

II - 7 - 2 - 1 - Dosage spectrophotométrique de l'activité PAL.

Dans un petit mortier, préalablement refroidi à + 4 C et placé dans un bac à glace, on place 0,2 à 0,6 g de poudre acétonique que l'on disperse dans 10 ml du tampon contenant 0,005 M d'ascorbate de sodium; le tout est homogénéisé délicatement avec le pilon pendant 3 minutes, puis avec un agitateur magnétique pendant 12 minutes. L'ensemble est ensuite

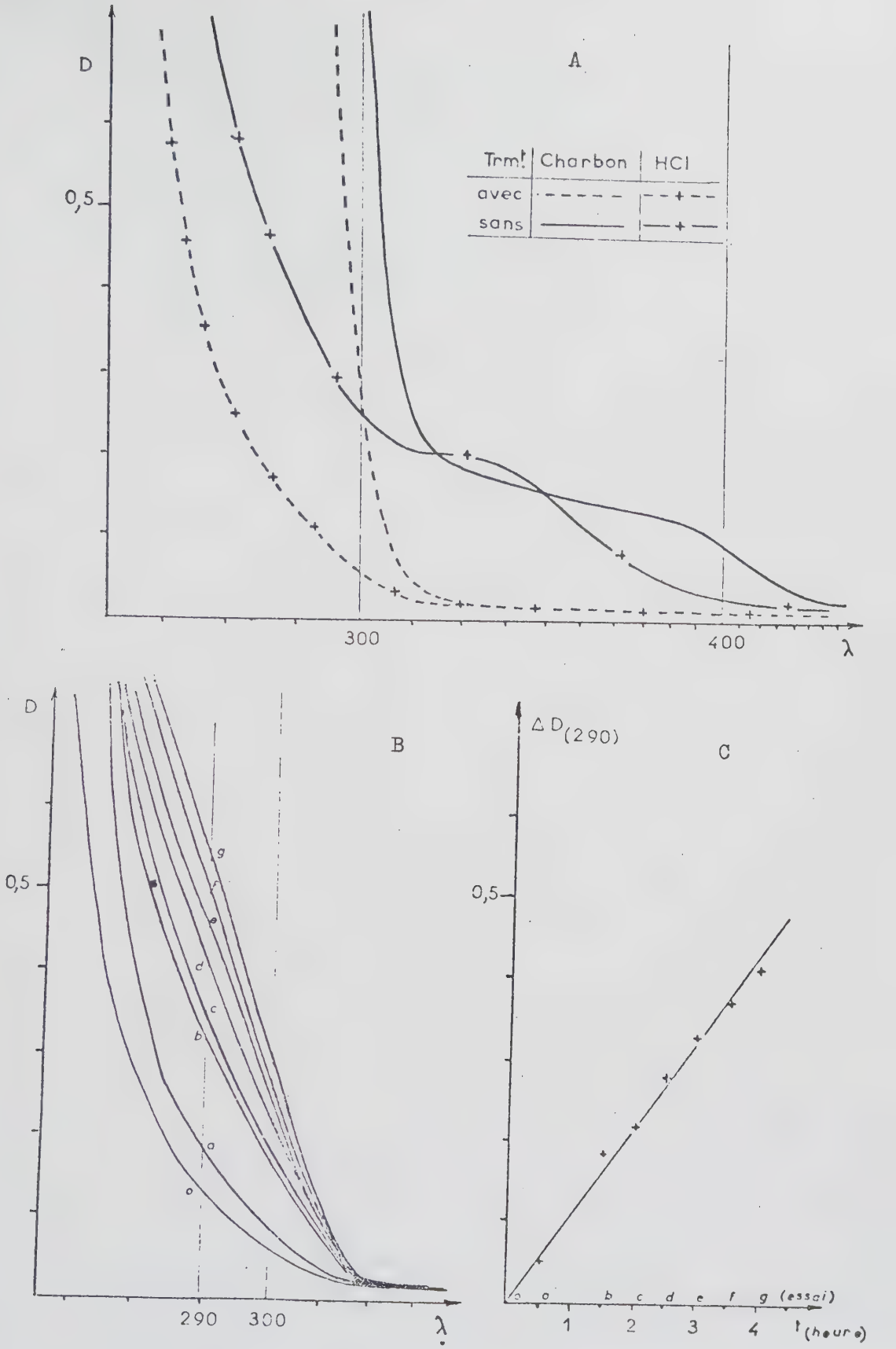


Figure 5- DOSAGE DE L'ACTIVITE PAL PAR SPECTROPHOTOMETRIE

A - Spectre d'absorption des extraits bruts de poudre acétonique avant et après acidification ou traitement par le charbon actif .

B et C - Variation du spectre d'absorption des prises d'essai diluées au cours du temps : B = spectre des essais successifs (0,a,b,c,d,e f,g)

C = variation de la densité optique à 290 nm

D 290 nm en fonction du temps dans ces essais .

(conditions expérimentales : voir texte) .

filtré sur 4 étamines superposées, lavées préalablement avec le tampon; le filtrat, récupéré dans des godets de "COREX", est centrifugé pendant 10 minutes à 4°C sous 4000 g pour éliminer les débris. On obtient ainsi un extrait jaune pâle dont l'adsorption entre 300 et 400 nm peut être modifiée par acidification (figure 5A). Les pigments jaunes résiduels, principalement de nature polyphénolique (MAJAK et TOWERS, 1973), sont éliminés par absorption sur du charbon actif selon la technique de RISSLAND et MOHR (1967). Pour cela, on disperse 0,3 g de charbon actif avec l'extrait obtenu dans le mortier refroidi et on élimine le résidu insoluble par une centrifugation de 10 minutes sous 10 000xg. On obtient ainsi un extrait relativement transparent aux environs de 300 nm après acidification (figure 5 A), qui, après filtration sur papier constitue l'extrait enzymatique brut (E.B). L'adsorption sur charbon actif peut être faite, sans inconvénient, lors de la première extraction : on mélange pour cela la poudre acétonique et le charbon actif avant extraction.

Le dosage de l'activité PAL est faite ensuite à 40 °C, à l'obscurité dans des tubes a essai bouchés. Le substrat est une solution de DL-phényl-alanine "NP" à 10 mg/ml dans du tampon. La dissolution de la phényl-alanine est faite dans quelques gouttes de HCl pur qui est ensuite dilué par du tampon ; la solution est amenée à pH 8,8 par de la soude, puis ajustée au volume final. On verse alors, dans deux tubes, 4 ml de EB, équilibré à 40 °C, et l'on ajoute à l'un 4 ml de tampon (témoin) et à l'autre 4 ml de substrat (essai). Les dosages sont faits toutes les 30 minutes, après dilution de 1 ml de prise d'essai dans 10 ml de HCl 0,1 N puis enregistrement du spectre d'absorption par mesure de la densité optique D à 290 nm (figure 5B). Dans ces conditions, la vitesse de réaction est constante pendant au moins 4 heures (figure 5C).

II - 7 - 2 - 2 - Dosage réflectométrique de l'activité PAL.

Les expériences témoins et les essais correspondant sont faits dans les mêmes conditions que précédemment, l'extrait brut étant remplacé soit par le surnageant purifié, soit par la suspension de chloroplastes. Après 4 heures, les réactions sont arrêtées par addition d'une quantité suffisante d'HCl pur pour avoir un pH voisin de 1. Comme les polyphénols, l'acide cinnamique est extrait à l'éther éthylique (paragraphe II - 3 - 5) puis séparé et dosé, sur couche mince, par réflectométrie.

II - 7 - 3 - Recherche de l'activité monophénoloxydase (MPO) de la phénolase.

La recherche de l'activité MPO dans les surnageants purifiés (Sg) et dans les suspensions de chloroplastes (Cp) est faite selon une technique voisine de celle de SATO (1966 , 1969). Le substrat est l'acide

p-coumarique "puriss FLUKA" : 4.10^{-3} M dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,0 contenant aussi de l'ascorbate de sodium "RP" 4.10^{-3} M. Les prises d'essai sont de 5 ml de Cp et 20 ml de Sg; dans tous les cas on réalise les essais témoins, ou la mesure, par dilution de Sg ou de Cp, par respectivement un volume de tampon ou de substrat. La réaction est faite à l'air libre à température ambiante (20 - 25°C); le mélange réactionnel occupant dans un erlenmeyer une hauteur d'un demi centimètre environ et étant agité continuellement et lentement, à l'aide d'un agitateur magnétique. Après 30 minutes, les réactions sont arrêtées par acidification ; l'acide caféique formé est isolé, purifié et dosé comme précédemment l'acide cinnamique.

Pour la mise au point des dosages on utilise la phénolase "WORTHINGTON - TCL - TY - 700 U/mg" isolée de champignon de couche ; la poudre lyophilisée est conservée à - 25°C au sec. Les activités MPO sont dosées, selon les indications du WORTHINGTON MANUAL (1972) avec comme substrat des solutions 10^{-3} M de tyrosine ou du mélange acide p-coumarique - acide ascorbique décrit plus haut. Les dosages sont faits soit par spectrophotométrie à 280 nm pendant 10 à 15 minutes lors de l'essai avec la tyrosine, soit par réflectométrie sur couche mince, comme précédemment, lors d'essai avec l'acide p-coumarique.

II - 7 - 4 - Recherche d'enzyme catabolisant les flavonols.

La recherche d'activité enzymatique catabolisant les flavonols est faite selon un protocole voisin de celui de HOSEL et BARZ (1972). Le substrat, kaempférol ou quercétol "puriss FLUKA", est dissout, à raison de 10 mg dans 5 ml de diglyme " PROLABO" puis dilué dans 10 ml de tampon phosphate 0,1 M - pH 7,5 ; lors des essais cette solution est utilisée après dilution au 1/25, v/v.

Dans tous les cas, les extraits enzymatiques sont obtenus à partir de poudres acétoniques de feuilles dans le tampon contenant 1 % de mercaptoéthanol " MERCK" selon le protocole déjà décrit. Le dosage est fait par spectrophotométrie; par référence au tampon, on mesure, en fonction du temps, la variation du spectre d'absorption entre 500 et 300 nm du substrat dilué volume à volume soit par du tampon (expérience témoin), soit par l'extrait brut (mesure). L'expérience est faite à 30°C à l'aide d'un porte cuve thermostaté, avec un spectrophotomètre enregistreur DK 2A. Les enregistrements successifs sont faits toutes les minutes, au moins au début de la mesure, pendant 15 minutes ; on met ainsi en évidence la transformation du produit en substrat à plusieurs longueurs d'onde et par formation de points isobestiques (MONTIES, 1969 b).

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

III - A - Identification des flavonoïdes des feuilles de Melon.

Nous avons rapporté en 1969, la présence de flavonosides hydrolysables dans les feuilles et les chloroplastes de Melon. Les réactions colorées et propriétés spectroscopiques de ces flavonoïdes étant celles de dérivés de type flavones (tableau 1B), nous avons dû préparer des flavones et flavonosides de référence. Ceci nous a permis de mettre au point les techniques utilisées ensuite pour identifier les flavonosides du Melon.

III - A - 1 - Contrôle des produits et méthodes de référence

Dans un premier temps nous avons extrait, sous forme de poudre lyophilisée, la lutéoline (Lu), l'apigénine (Ap), l'acacétine (Ac). Nous avons purifié de façon préparative, sur papier WHATMAN 3MM, ces trois flavones qui ont dans le système n-butanol-acide acétique-eau (100, 27, 73 en volume) les R_F 0,83 (Lu), 0,89 (Ap), 0,94 (Ac) Les produits ainsi obtenus sont chromatographiquement purs et sont stables en solution méthanolique saturée, plusieurs mois, à -25°C. Nous avons ensuite vérifié que les propriétés spectroscopiques de ces flavones (tableau 5A) entre 250 et 500 nm sont conformes à celles données dans la bibliographie (MABRY et al., 1970). De façon générale, les positions des pics observées concordent à quelques nanomètres ($\pm$ 3 nm) avec ceux rapportés par MABRY et al.

Il convient de souligner que la mise en évidence d'hydroxyles libres, portés par le noyau flavone, par analyse spectroscopique, est parfois délicate à conduire. C'est ainsi que l'effet hyperchrome en présence de méthylate de sodium, indice d'un 4'-hydroxyle libre (tableau 1B), est parfois faible et difficile à mettre en évidence vraisemblablement à cause de l'instabilité des produits. De même la mise en évidence, de la fonction 3,4-dihydroxyle par formation d'un complexe avec $AlCl_3$ qui est ensuite détruit par acidification avec HCl, est très reproductible à condition d'éliminer des solvants les traces d'eau susceptibles d'hydrolyser $AlCl_3$ avec production de HCl (MONTIES et DOUILLARD, 1969). Les autres réactions, mise en évidence d'un 7-hydroxyle libre, ionisé spécifiquement par l'acétate de sodium ou mise en évidence de la fonction 3', 4'-dihydroxyle, par formation de complexes avec H_3BO_3 en présence d'acétate de sodium, sont aussi reproductibles si l'on prend soin d'éliminer toute trace d'acide des réactifs (MABRY et al., 1970) ainsi que des solutions de flavones éluées des chromatogrammes.

Ce premier ensemble d'expériences nous a donc permis, de mettre au point le protocole de caractérisation par spectroscopie UV des flavones et de vérifier que les flavones purifiées correspondent bien aux

Tableau 5 - IDENTIFICATION DES FLAVONES ET FLAVONOSIDES DE

Réactif	Apigénine	Acacétine	Lutéoline
Seul	269,é 290,336	269,é 291,324	253,2[illegible],é 290,347
+ Na OCH_3	273,é 32[illegible],397 (+)	276,é 293,358 (-)	é266,270,é302,403(+)
+ $AlCl_3$	275,299,349,381(-)	275,299,349,381(-)	273,295,418 (+)
+ $AlCl_3$ + HCl	[illegible],299,349,[illegible] (-)	[illegible],299,349,[illegible] (-)	2[illegible],2[illegible],é293,330,3[illegible](-
+ Na CO_2CH_3	275,309,383	276,294,359 (-)	269,é324,380
+ Na CO_2CH_3+H_3CO_3	268,342	269,330	260,366,é432

A - Identification spectroscopique des flavones de référence

(effet hyperchrome (+) et hypochrome (-)é : épaulement)

	Saponarine	Lutonarine
Seul	271(101),331(100)	253(115),270(120),347(100)
+ Na OCH_3	275(87),303(53),390(110)	276(111),é300,406(78)
+ $AlCl_3$	279(95),300(74);350(95),380(75)	277(147),334(45),426(115)
+ $AlCl_3$ + HCl	279(95),300(74),350(95),380(75)	278(113),é366(73),388(80)
+ Na CO_2CH_3	270(95),391(77)	266(133),392(80)
+ Na CO_2CH_3+H_3BO_3	271(95),339(91)	263(140),373(91)

B - Identification spectroscopique des flavonosides de référence

(entre parenthèse : hauteur relative des pics)

structures 4',5,7-trihydroxyflavone (Apigénine : Ap) ; 3',4',5,7-tétrahydroxyflavone (Lutéoline : Lu) et 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone (Acacétine : Ac) .

Dans un second temps , ayant constaté que les flavonosides du Melon ont des propriétés de C-glycosylflavones , nous avons préparé des C-glycosylflavonosides de référence . Nous avons donc purifié , à partir de feuilles de Saponaire et d'Orge , respectivement :

. la Saponarine (Sp) : 7-O-glucosido-6-C-glucosyl-apigénine ;

. la Lutonarine (Lt) : 7-O-glucosido-6-C-glucosyl-lutéoline

découvertes par SEIKEL et GEISSMAN (1957) et SEIKEL et BUSHNELL (1959) .

Il est remarquable que lors des deux premières extractions faites au Soxhlet avec le mélange éther de pétrole-méthanol puis l'éther éthylique , et dans tous les cas , on ait obtenu , sur les parois du ballon , un dépôt de substances jaunes solubles seulement dans l'eau et dans le méthanol et semblables à des flavonoïdes . L' analyse de ces substances n'a pas été faite . Par la suite , nous avons en effet , purifié les seuls flavonosides extraits par le méthanol (fraction Me) . La séparation préparative de la saponarine et de la lutonarine a été faite , soit sur papier WHATMAN 3MM , comme dans le cas des flavones , les R_F étant alors 0,47 (Sp) et 0,39 (Lt) respectivement soit , sur couche mince de cellulose MN 300 avec pour solvant l'acide acétique aqueux à 15% et pour R_F 0,67 (Sp) et 0,50 (Lt) . Les flavonosides ainsi obtenus sont spectroscopiquement purs et stables quelques mois , à 4°C , en solution méthanolique saturée . La saponarine cristallise rapidement sous forme de sphéro-cristaux .

Ces flavonosides étant purifiés , nous avons vérifié par spectroscopie l'état des hydroxyles portés par leur cycle flavone . Pour cela nous avons comparé les déplacements des pics d'absorption respectivement de la saponarine avec l'apigénine et de la lutonarine avec la lutéoline (tableau 5) . En comparant ces six séries de spectres , on constate que tous les hydroxyles des flavones sont libres , sauf celui placé en 7 puisque , en présence d'acétate de sodium , la position de la bande II , aux environs de 270 nm n'est pas déplacée . Ces résultats confirment ceux de SEIKEL cités plus haut . Cet auteur a montré que la saponarine et la lutonarine sont des 7-O-glucosides de la 6-C-glucosyl apigénine : isovitexine (It) et de la 6-C-glucosyl lutéoline : isoorientine (Io) respectivement . Pour préciser cette structure , nous avons étudié la cinétique d'hydrolyse acide de ces substances . Les résultats sont présentés sur la figure 6 . Par la suite , et dans tous les cas , nous avons figuré les couleurs que l'on observe après révélation par le réactif de NEU et irradiation sous ultraviolet au moyen du code proposé par NYBOM (1967) et rappelé dans cette figure . Les produits d'hydrolyse : isovitexine , isoorientine , vitexine (Vi) : 8-C-glucosyl-apigénine et orientine (Or) : 8-C-glucosyl-lutéoline ont été identifiés par référence aux données de WAGNER et al. (1970) . On remarque

igure 6 - CINETIQUE D'HYDROLYSE DE LA SAPONARINE (Sp) ET DE LA LUTONARINE (It)
EXTRAITES D'ORGE (It=isovitexine , Io=isoorientine , Vi=vitexine , Or=orientine)

Hydrolyse : sous reflux , Ethanol + Eau + HCl = 1+1+0,4 vol.
Chromato : Cell MN 300 - ac. Acétique aqueux 15%

Bleu Jaune Rouge

premièrement qu'il faut environ 1 heure pour hydrolyser la saponarine et surtout la lutonarine : la lenteur relative de ces hydrolyses correspond bien à celle de composés de type 7-O-glycosides de l'apigénine et de la lutéoline (HARBORNE , 1965) . Deuxièmement , on constate qu'il se forme dès le début de l'hydrolyse de l'isovitexine et de l'ioorientine ; comme , par ailleurs , nous avons vérifié par chromatographie sur couche mince que le glucose est le seul autre produit libéré , nous pouvons conclure , et confirmer , que les deux flavonosides sont des 7-O-glucosides . Troisièmement , on observe la formation de vitexine et d'orientine , qui s'accumulent en équilibre avec l'isovitexine et l'isoorientine par transposition de WESELY-MOSER (CHOPIN , 1966) , sans qu'il y ait , même après plusieurs heures , d'accumulation d'apigénine ou de lutéoline . Ce dernier résultat est caractéristique du groupe des C-glycosylflavones (CHOPIN , 1966 ; ALSTON , 1968 ; PARIS , 1973) substances réputées rares jusqu'à ces dernières années , parmi lesquelles figurent la saponarine , la lutonarine et les flavonoïdes de la feuille de Melon comme nous allons le montrer maintenant .

III - A - 2 - Identification des flavonosides du Melon .

Nous avons préparé les flavonosides des feuilles de Melon par extraction au Soxhlet de poudre de feuilles ; par le méthanol nous avons obtenu une solution jaune (fraction Me) puis par l'eau , une solution brune (fraction Aq) . Nous avons constaté que la fraction Aq contient , en plus des flavonosides présents dans Me des produits d'hydrolyse de ceux-ci (MONTIES , 1969) .

Les flavonosides ont été soumis à deux séparations préparatives successives : sur papier 3 MM tout d'abord , puis sur couche mince de cellulose. Sur papier 3 MM , on obtient deux bandes nommées "A" (R_F = 0,55) et "L" (R_F = 0,50) dont les réactions colorées sont voisines de celles de l'apigénine ("A") et de la lutéoline ("L") . Les éluats méthanoliques concentrés de ces deux bandes sont ensuite purifiés sur couche de cellulose MN 300 , au moyen de deux migrations successives dans l'acide acétique aqueux à 5% (v/v) . La bande "A" est ainsi résolue en deux bandes A et a et la bande L en L et l . Les quatre composés A,L,l,a sont chromatographiquement (tableau 6) et électrophorétiquement (figure 16) purs . En supposant que ces quatre flavonosides aient des coefficients d'absorption molaire égaux à celui de la rutine , on trouve en moyenne des proportions de A , L voisines de 30 à 40% alors que celles en a et l sont de l'ordre de 10% . La teneur moyenne est de 5 mg de flavonosides pour 100 mg de feuilles sèches . Le rendement des deux chromatographies successives étant de 15% , il est nécessaire , pour préparer quelques milligrammes de a ou l , de purifier les flavonoïdes extraits à partir de 10 g de feuilles , ce qui

Résultats : exprimés en R_Fx100 ; abréviations : méthanol(Me) , éthanol(Et) , butanol normal ou tertiaire (n ou t-Bu) , acides formique(Fm) et acétique(Ac) , acétate d'éthyle (AE) , méthyl-éthylcétone (BO) , eau (Aq) ; autres abréviations : figure 9 .

Support	Solvant	A	a	L	l	Sp	Lt	It	Vt	Io	Or
COUCHES MINCES											
Cell MN 300	: Ac 30% Aq	86	79	83	71	85	73	72	52	56	37
"	: Ac 15% Aq	78	62	71	56	65	49	46	24	33	14
"	: Ac 5% Aq	54	34	47	27	44	31	21	7	12	6
"	: Aq	45	20	41	17	28	14	10	5	6	3
"	: n Bu + EtOH + Aq = 40+10+50(épiphase)	80	75	77	70	75	57				
"	: n Bu + Ac + Aq	67	67	51	51	56	39				
"	: Ac + HCl + Aq = 60+6+30	87	80	80	79	84	76	83	72	73	59
"	: Ac + Fm + Aq = 100+20+30	55	58	43	49	35	22				
Polyamide MN	: $CHCl_3$ + Ac + Aq = 50+30+10	46	28	20	14	40	11	52	51	37	33
"	: $CHCl_3$ + Ac + Aq = 30+50+10	75	68	57	54	72	44	65	65	56	45
"	: Me + Ac + Aq = 90+5+5	70	66	69	61						
Silicagel G	: Bo + AE + Ac + Aq = 50+30+14+10	34	38	27	32	26	16	80	65	63	67
PAPIER											
Whatman 3 MM	: n Bu + Ac + Aq = 100+27+73	55	55	50	50	47	39	69	56	47	36
"	: " = 60+20+20	41	36	28	24						
"	: t Bu + Ac + Aq	36	30	22	20	21	9	50	33	31	18
"	: Acét 5% Aq	67	50	57	41	45	30	28	11	16	6
Whatman 1	: "	67	47	56	42	47	32	28	13	16	5

conduit à faire d'abord environ 100 séparations sur papier puis 300 sur couche de cellulose . Les quatre composés , que nous avons appelé mélosides A , L , a et l sont stables , en solution méthanolique saturée et à - 25°C , pendant plusieurs mois .

Dans un premier temps , nous avons étudié la structure des deux principaux mélosides A et L par spectrophotométrie dans le proche ultraviolet puis par cinétique d'hydrolyse acide .

III - A - 2 - 1 - Propriétés spectroscopiques des mélosides A et L .

Nous avons présenté dans la figure 7 le spectre d'absorption des quatre mélosides . Compte-tenu de la forme des spectres des flavones (GEISSMAN , 1955 - JURD , 1962 - MABRY et al. 1970) il est raisonnable d'affirmer que les spectres des mélosides (figure 7) sont de type flavone ; en particulier , les spectres des mélosides A et L sont très voisins de ceux de l'apigénine et de la lutéoline respectivement . Compte-tenu de l'absorption importante de a et l vers 255 nm on est conduit à rapprocher aussi ces deux mélosides de dérivés de la lutéoline .

Sur la figure 8 , nous avons présenté les déplacements du spectre d'absorption des mélosides A et L . Compte-tenu d'une part , de la position des maximums et , d'autre part , de la vitesse des réactions qui sont voisines de celles des flavones et flavonosides de référence (tableau 5) , il est raisonnable de conclure que les mélosides A et L sont respectivement des dérivés de l'apigénine et de la lutéoline et que tous leurs hydroxyles (3' , 4' , 5 et 7) sont libres . Nous avons cherché à confirmer ces conclusions par analyse chromatographique .

III - A - 2 - 2 - Comparaison chromatographique des mélosides .

Nous avons d'abord séparé les mélosides par chromatographie sur cellulose MN 300 imprégnée de molybdate de sodium 0,1 M . Lors des chromatographies sur papier , d'après PRIDHAM (1959) , la formation de complexes entre le molybdate et les ortho-diphénols suffit pour empêcher leur migration . Nous avons constaté (tableau 7) que le même résultat est valable sur cellulose confirmant ainsi la structure de type lutéoline des mélosides L , a et l . Nous avons recherché une seconde confirmation , en comparant les R_F de 17 flavonoïdes différents par le nombre de leurs substituants ; pour cela nous avons adapté le solvant " classique " (BATHE-SMITH , 1963) de FORESTAL (figure 9) à la chromatographie sur couche de cellulose .

Nous avons constaté que l'introduction d'un hydroxyle provoque un abaissement de 0,25 à 0,30 unités R_M tant dans la série des flavones que dans celle des flavonosides et cela quelle que soit la position des autres

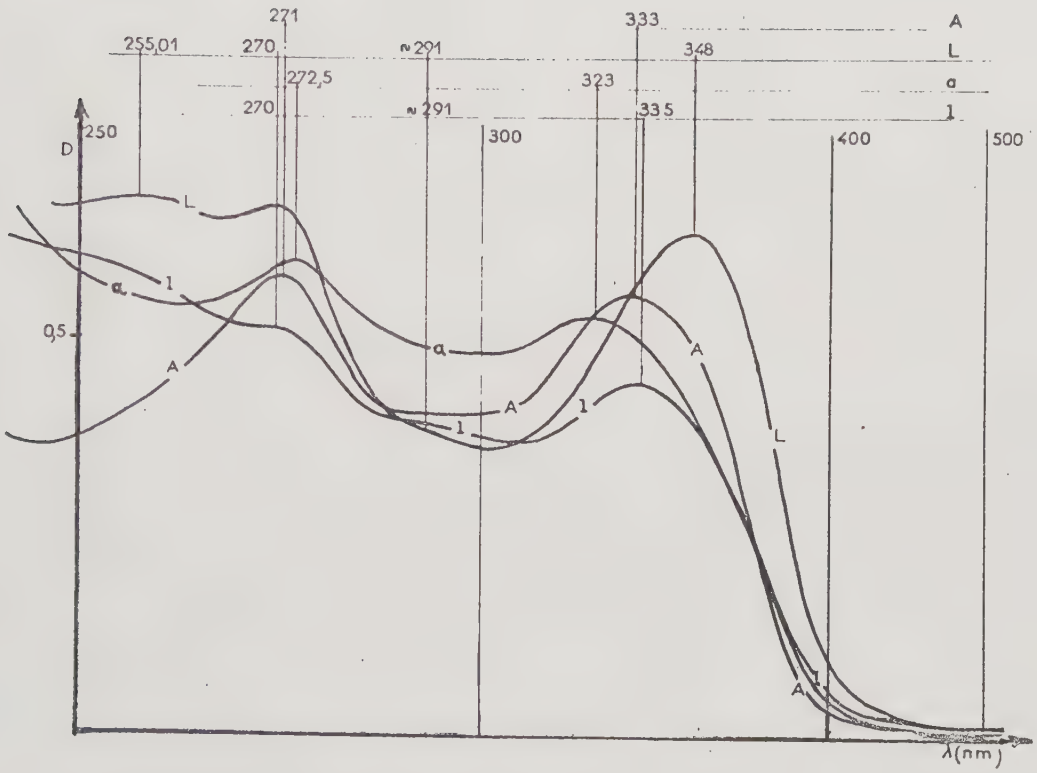
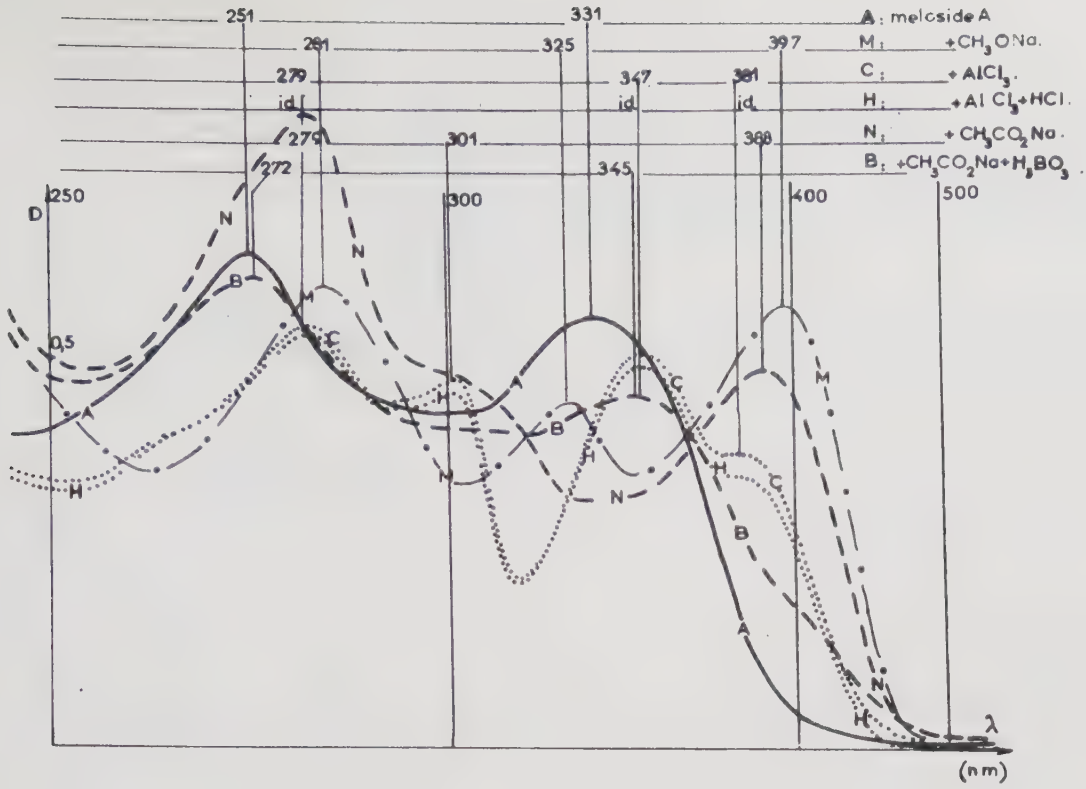
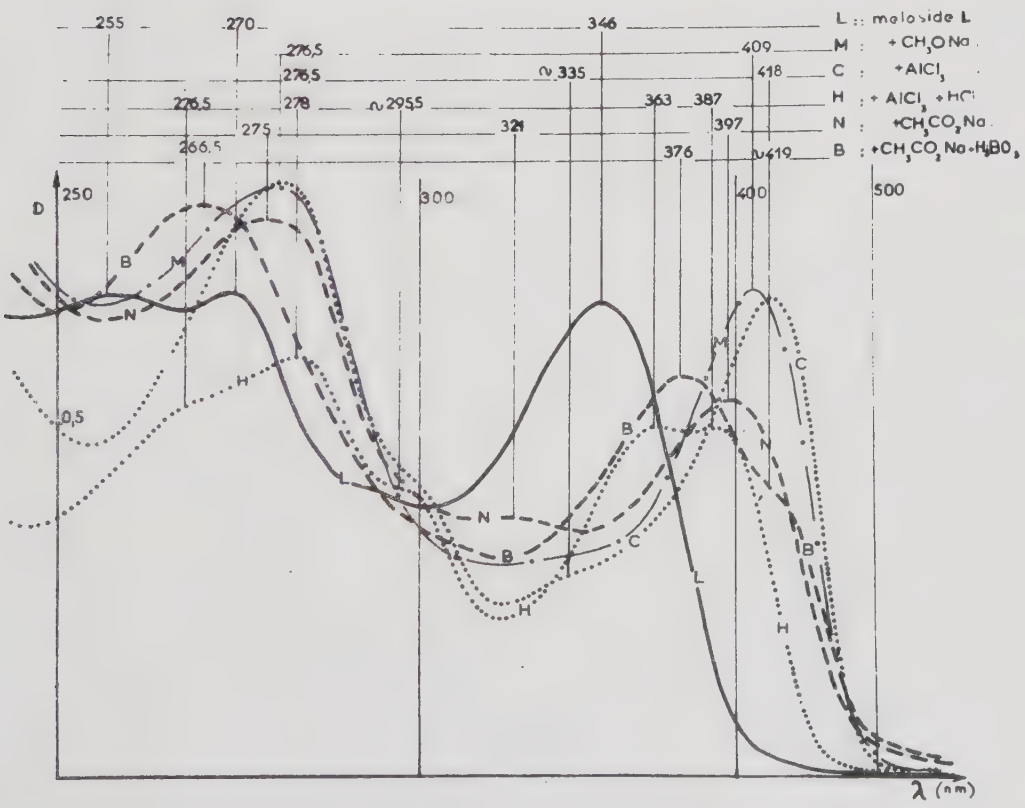


Figure 7 - Spectre d'absorption des mélosides A , L , a , 1 dans le méthanol .



Méloside A



Méloside L

Figure 8 - Spectre d'absorption et déplacements du spectre des mélosides A et L en solution dans le méthanol .

Tableau 7 - MODIFICATION DU R_F DES FLAVONOSIDES PAR FORMATION DE COMPLEXE AVEC LE MOLYBDATE DE SODIUM SUR COUCHE DE CELLULOSE .

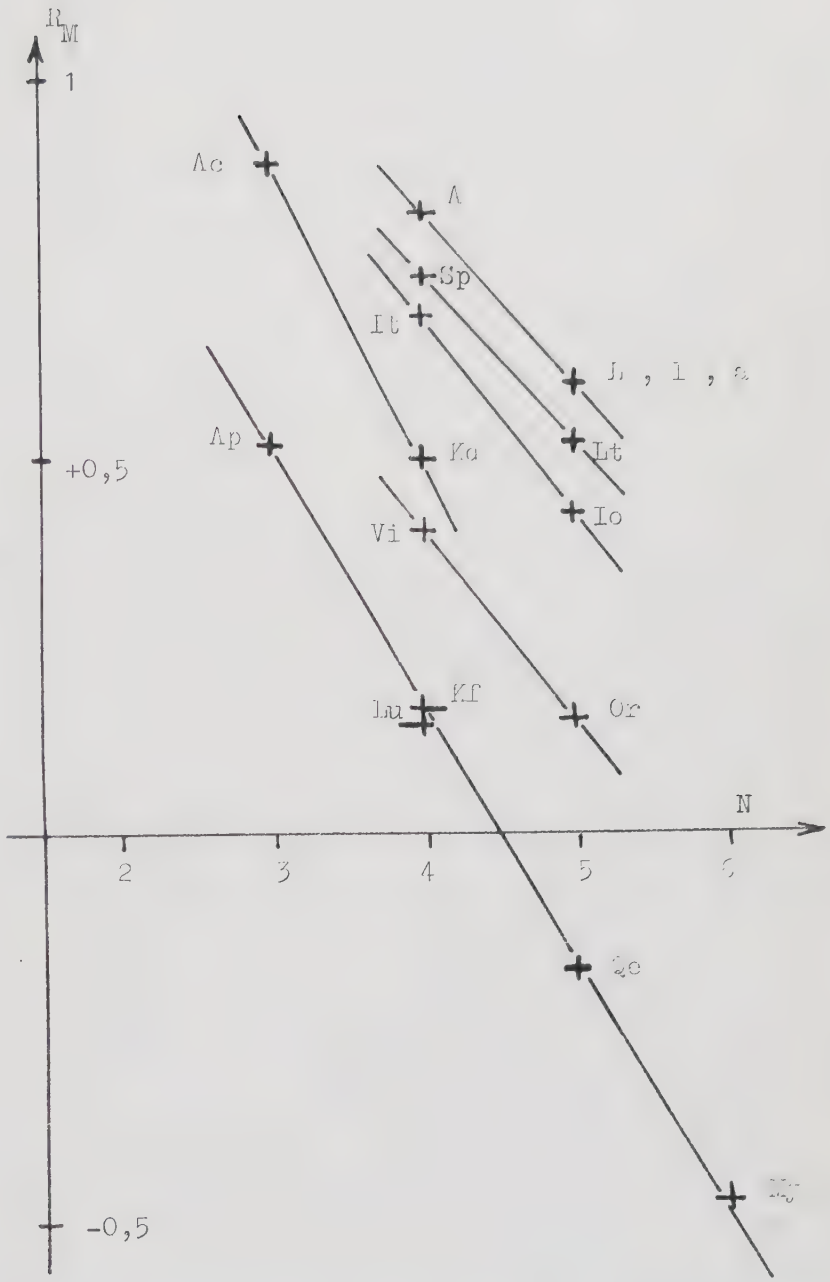
Chromatographie : couche de cellulose MN 300 (0,75 mm) dispersée dans l'eau (témoin) ou dans du molybdate de sodium 0,1 M (essai)

Solvant : eau

R_F	A	a	L	l	Sp	Lt	Rutine
Témoin	0,46	0,20	0,36	0,17	0,28	0,12	0,54
Essai	0,32	0,01	0,00	0,00	0,17	0,00	0,03

tine : (Ac) : 5,7 OH - 4' , Me
nine : (Ap) : 4',5,7 OH
line : (Lu) : 3',4',5,7 OH
férol : (Kf) : 4',3,5,7 OH
féride : (Kd) : 3,5,7 OH - 4' Me
étine: (Qe) : 3',4',3,5,7 OH
étine: (My) : 3',4',5',3,5,7 OH
texine : (It) : 4',5,7 OH - 6 Glc
ine : (Vi) : 4',5,7 OH - 8 Glc
arine : (Sp) : 7 - O - Glc - It
ientine : (Io) : 3',4',5,7 OH - 6 Gl
tine : (Or) : 3',4',5,7 OH - 8 Glc
arine : ([illegible]) : 7 - O - Glc - [illegible]
ide A , L , a , l

$$R_M = \log \frac{1}{R_F - 1}$$



Séparation : CM Cellulose MN 300 - Ac. Acétique + HCl + Eau = 60+6+30 vol.

Les chiffres indiquent la position des différents substituants : Me (méthoxyle) , OH (hydroxyle) , Glc(-glucosyl) .

Figure 9 - EFFET DU NOMBRE DES SUBSTITUANTS (N) SUR LE R_M DES FLAVONOÏDES .

substituants . Le même résultat étant obtenu dans la série des mélosides , il paraît raisonnable de conclure que les mélosides L , a , l diffèrent de A par la présence d'un hydroxyle supplémentaire en 4' sur le cycle B .

Pour préciser ce prèmier groupe de résultats nous avons comparé les produits d'hydrolyse acide , alcaline et enzymatique des mélosides .

III - A - 2 - 3 - Hydrolyse acide des mélosides , structure de A et L .

Nous avons , tout d'abord , comparé les produits d'hydrolyse acide des mélosides A et L avec ceux de la saponarine et de la lutonarine . Nous avons constaté , par chromatographie (figure 10) , que les produits d'hydrolyse It et Vt de la saponarine , Io et Or de la lutonarine ont le même comportement chromatographique que ceux du méloside A et du méloside L respectivement dans plusieurs solvants (tableau 6) . Après avoir isolé de façon préparative sur couche mince , les deux produits d'hydrolyse du méloside A , nous avons vérifié qu'ils sont interconvertibles l'un dans l'autre dans les conditions d'hydrolyse acide . En conséquence il paraît raisonnable de supposer que les mélosides A et L sont , comme la saponarine et la lutonarine et pour les mêmes raisons (figure 6) , des dérivés hydrolysables de l'isovitexine et de l'isoorientine respectivement .

Comme cependant , il n'est pas possible de distinguer , en général , les différentes C-glycosylflavones par chromatographie sur couche mince , nous avons comparé les produits d'hydrolyse des mélosides A et L avec ceux de la saponarine extraite de Sapnnaire ou d'Orge ainsi que de la lutonarine d'Orge au moyen du solvant A.P.E.M.B.(*) proposé par CHOPIN et al. (1972) qui permet , sur couche mince de silicagel , de distinguer les C-glucosylflavones des autres C-glycosylflavones .

Dans ces conditions , nous n'avons constaté aucune différence entre les produits d'hydrolyse des mélosides A et L et ceux de la saponarine et de la lutonarine qui sont des C-glucosylflavones .

Compte-tenu de ces résultats , il nous paraît justifié d'affirmer que les mélosides A et L sont des composés hydrolysables de C-glucosylflavones respectivement dérivés de l'isovitexine : méloside A et de l'isoorientine : méloside L .

Pour préciser ces résultats nous avons donc , comme précédemment (figure 6) , étudié la cinétique d'hydrolyse acide de ces deux mélosides . Lors de l'hydrolyse acide standard des mélosides A et L purs , nous avons observé que :

- 1 - l'hydrolyse des mélosides est totale après 30 minutes ;

(*) acétate d'éthyle - pyridine - eau saturée d'acide borique - méthanol : 80 - 12 - 10 - 5 , v/v .

- 2 - le premier produit d'hydrolyse est pour A , l'isovitexine et pour L, l'isoorientine ;

- 3 - la vitexine et l'orientine ne commencent à se former qu'après 1 heure ;

- 4 - le glucose est le seul ose libéré par hydrolyse , nous avons obtenu le même résultat avec la saponarine et la lutonarine tant après hydrolyse acide qu'enzymatique .

Compte-tenu de la rapidité relative de l'hydrolyse des mélosides A et L et du fait que , d'après leurs propriétés spectroscopiques , tous leurs hydroxyles sont libres , il est justifié de supposer que les mélosides A et L ont pour structure :

mélosides A = 6-C-glucosido-glucosyl-apigénine

mélosides L = 6-C-glucosido-glucosyl-lutéoline

Sur la figure 11 nous avons représenté la cinétique d'hydrolyse du mélange (fraction Me) des mélosides ; on peut constater sur cette figure, que l'hydrolyse des mélosides a et l ne libère pas d'autres flavones que A et L . En particulier , la tache notée X (figure 11) qui correspond certainement à des produits de dégradation et qui possède certaines réactions colorées de flavonoïdes (fluorescence jaune vif sous U.V 360 en présence de NH_3) n'a pu être identifiée , après chromatographie , à aucune des flavones de référence . De même , après hydrolyse oxydante , en présence de $FeCl_3$ selon FAIRBAIRN et SIMIC (1963) , nous n'avons pu mettre en évidence de façon certaine l'apigénine et la lutéoline parmi les produits d'hydrolyse . Un tel résultat est finalement peu surprenant compte-tenu du faible rendement que l'on peut attendre d'un tel traitement . Ainsi l'ensemble de ces résultats confirme les propriétés de " flavones difficilement hydrolysables " des quatre flavonosides des feuilles de Melon .

III - A - 2 - 4 - Hydrolyse alcaline et enzymatique des mélosides .

Afin de préciser ces résultats , nous avons réalisé les hydrolyses alcaline et enzymatique comparées des mélosides . Les résultats sont présentés sur les figures 12 à 14 . Avec les mélosides A et L , on n'a constaté aucune hydrolyse alcaline (figure 12) : ces flavonosides ne contiennent donc pas de fonction ester . Ils sont , au contraire , hydrolysés par l'hemicellulase (figure 13) et la rapidase (figure 14), avec respectivement libération d'isovitexine et d'isoorientine et , dans les deux cas , production de glucose . Ces résultats confirment donc les deux structures propo-

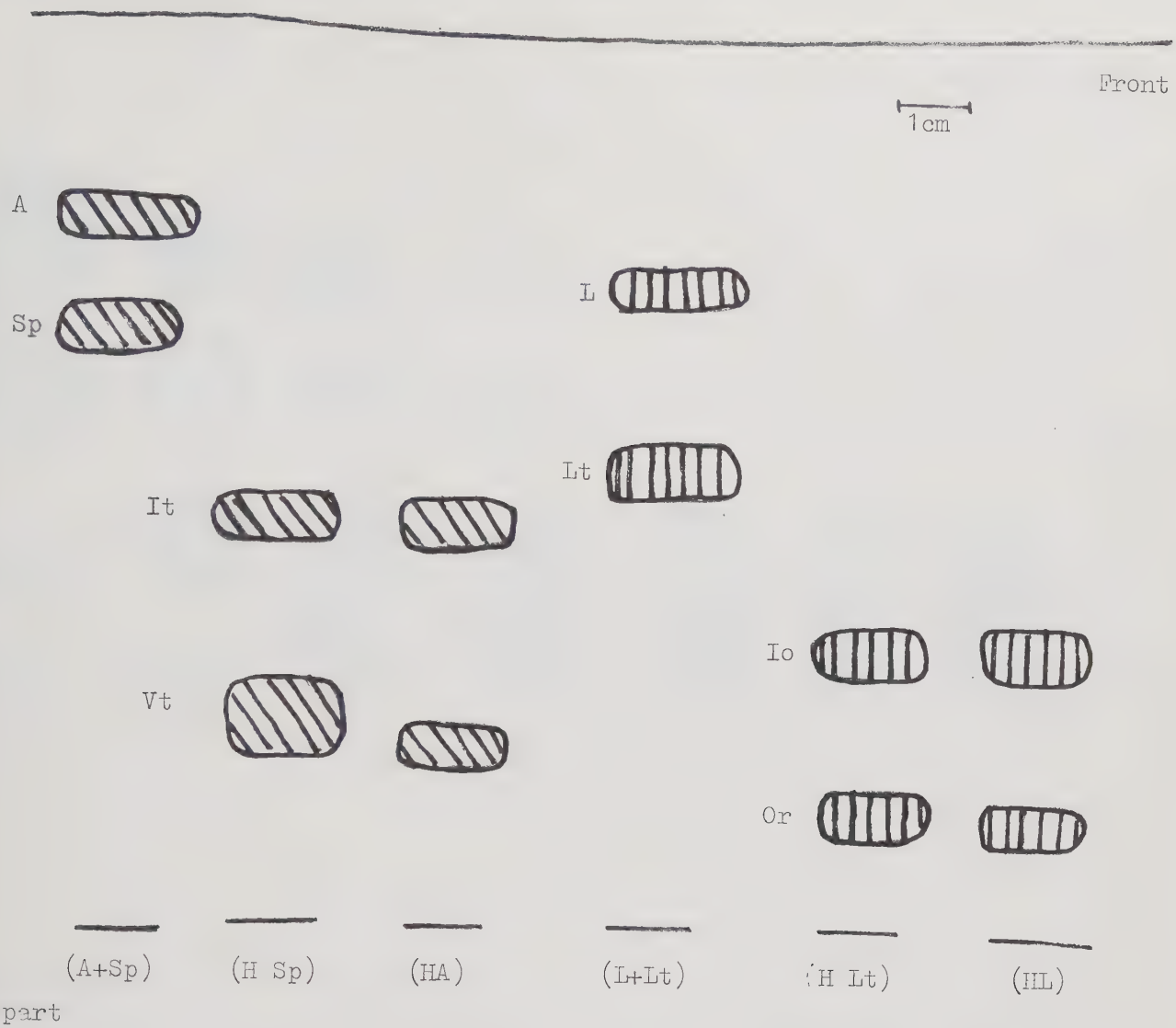


Figure 10 - HYDROLYSE ACIDE COMPAREE DES MELOSIDES A ET L AVEC LA SAPONARINE (Sp) ET LA LUTONARINE (Lt) (Extrait d'Orge)

Hydrolyse = Ethanol + eau + HCl = 1+1+0,4 vol , 3 heures , sous reflux .

Chromatographie : Cell MN 300 , ac. Acétique aqueux 15%

Chargement : quantité égale d'hydrolysat (HX) du flavonoside (X).

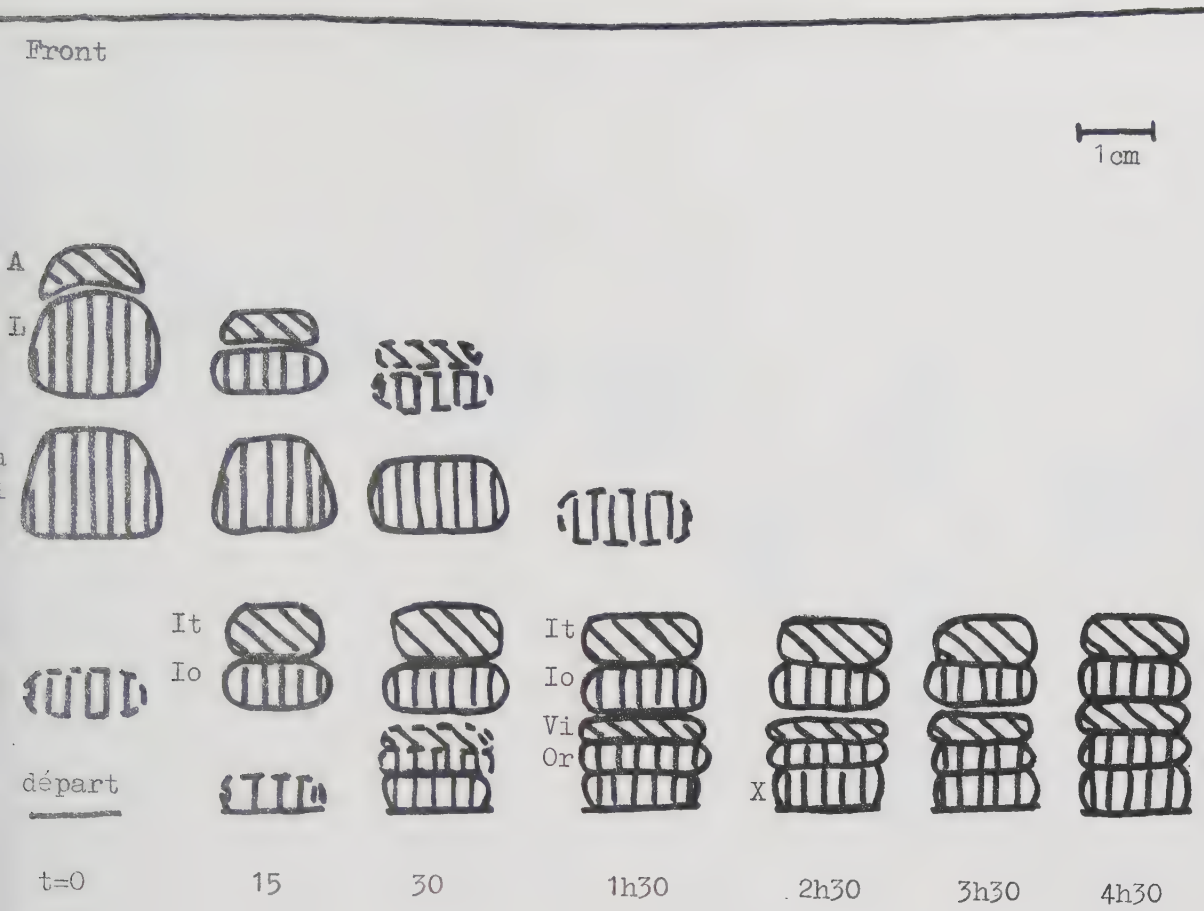


Figure 11 - CINETIQUE D'HYDROLYSE ACIDE DES FLAVONOSIDES DU MELON

Hydrolyse : HCl aqueux 2 N , **en tube bouché , bain de sable à 100°C .**
Chromatographie : Cell MN 300 , ac. Acétique aqueux 5%

Seules les taches de flavones (A,L,a,l,It,Io,Vi,Or) sont figurées :

- couleur brune sous UV 360 devenant jaune en présence d'ammoniaque
- jaune après révélation par $AlCl_3$.
- après révélation avec le réactif de Neu , couleur visible :

	avant UV 360	après UV 360
A	jaune ocre	rouge
L	jaune	jaune vif
a	jaune	vert jaune
l	jaune	vert jaune

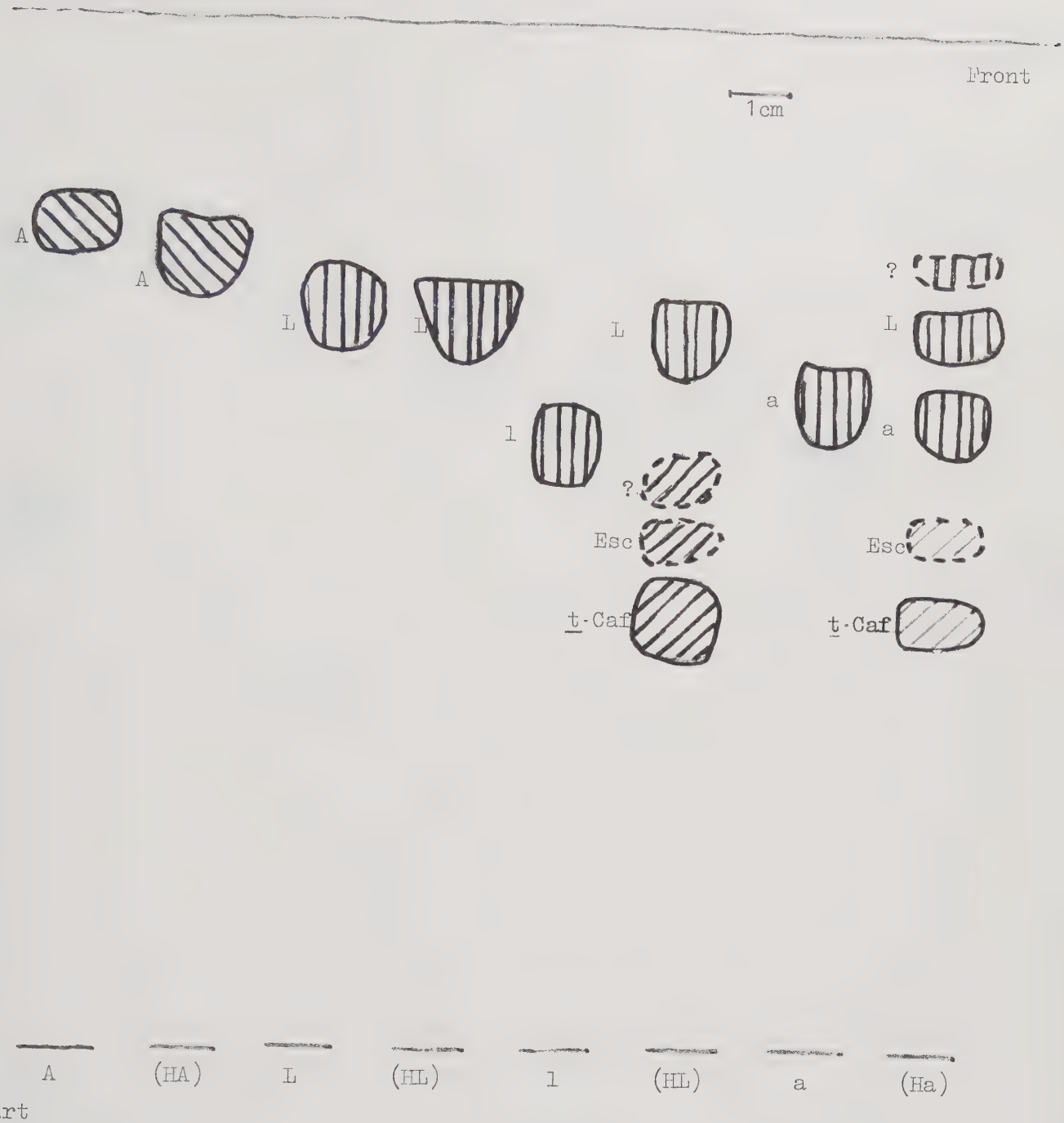
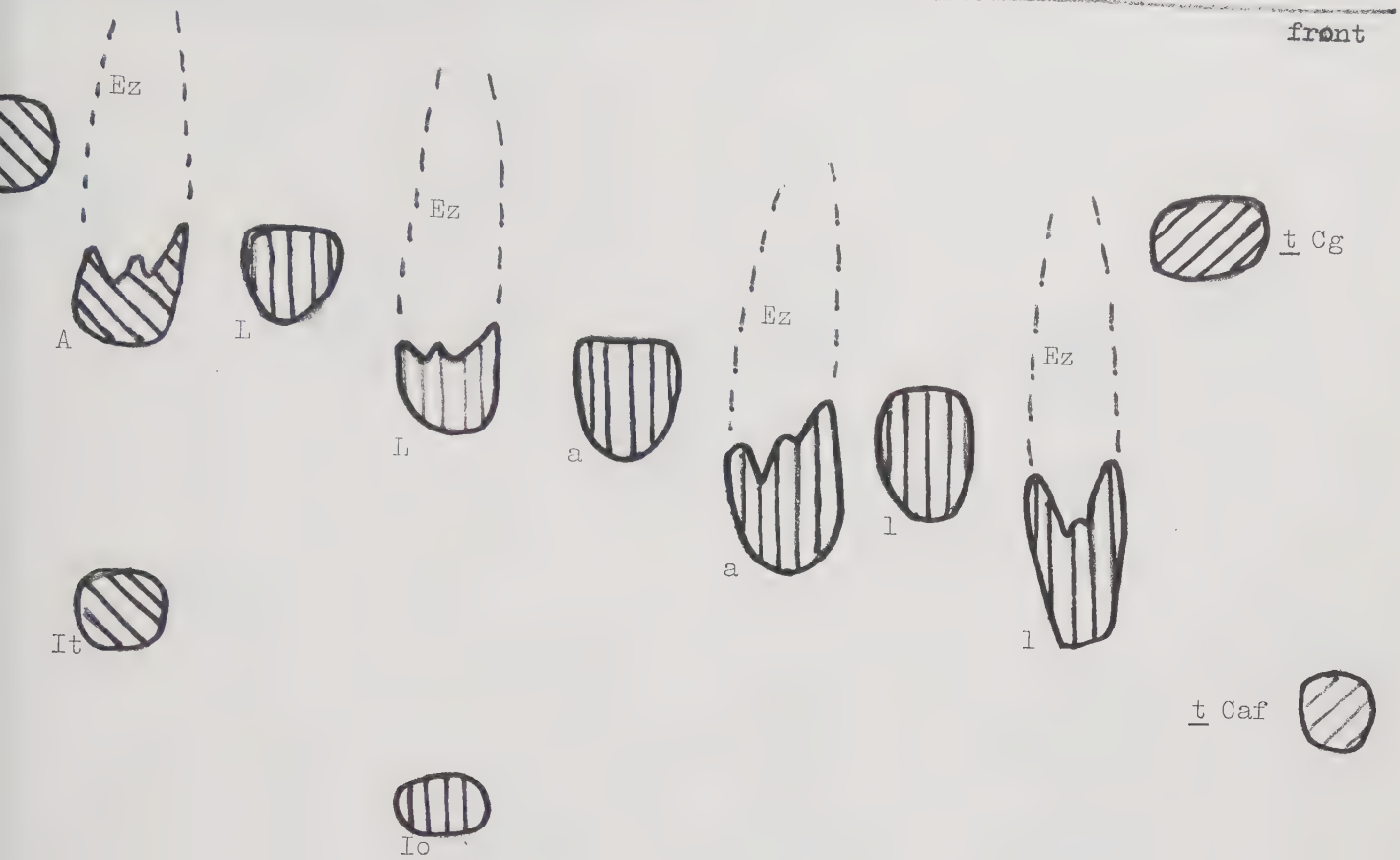


Figure 12 - HYDROLYSE ALCALINE COMPAREE DES MELOSIDES A, L, l, a .

Hydrolyse = NaOH 2 N sous azote - 2 heures - 0°C.

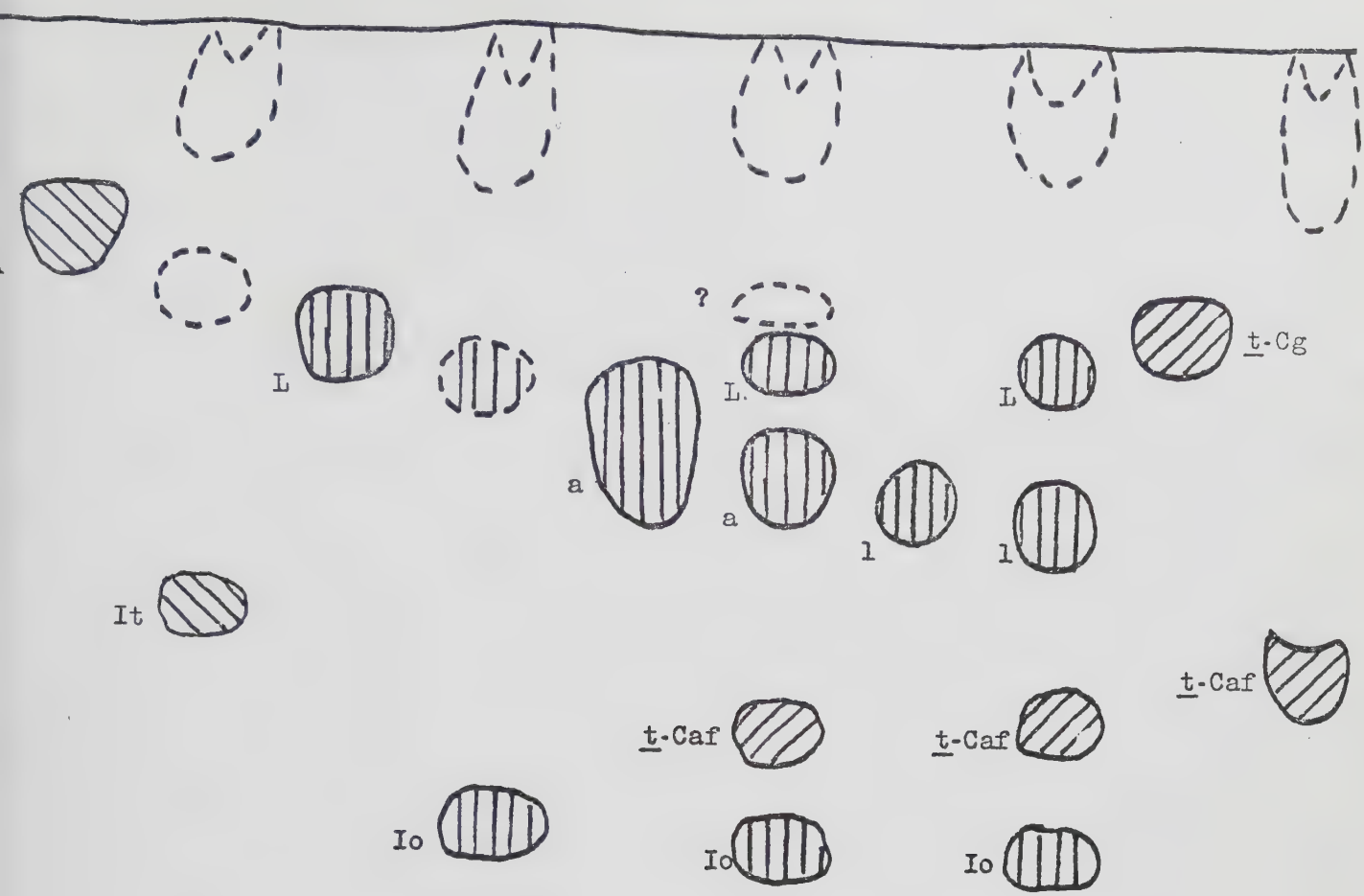
Chromatographie : Cell MN 300 , ac. Apétique aqueux 15%



(HA) L (HL) a (Ha) l (Hl) Cg (H Cg)

13 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE (HEMICELLULASE , SIGMA) DES MELOSIDES A L a l

Hydrolyse = tampon ac. acétique/acétate de sodium 0,1 M , pH 4,5 - 50° - 4 heures .
Chromatographie = Cell MN 300 , ac. Acétique aqueux 15%



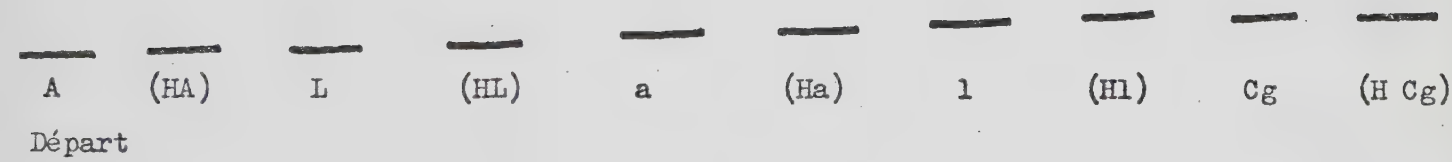


Figure 14 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE (Rapidase ⁑ = LA RAPIDASE) DES MELOSIDES A,L,a,l .

⁑ La Rapidase est un mélange d'hémicellulases . d'estérases , de pectine-estérases utilisée pour clarifier les jus de fruits .

Hydrolyse = tampon ac. acétique/acétate de sodium 0,1 M , pH 4,6 , 50°C, 4 heures .

Chromatographie : Cell MN 300 , ac. Acétique aqueux 15%

sées précédemment : ils sont comparables à ceux obtenus par HOROWITZ et GENTILI (1966) ou WAGNER et al. (1972) qui , eux aussi , ont décrit des C-glycosido-glucosyl-flavonoïdes . Au contraire , l'hydrolyse alcaline des mélosides 1 et a libère respectivement les mélosides L et A et , dans les deux cas , de l'acide trans caféique ainsi que des traces d'esculétine. Nous avons vérifié , par hydrolyse modèle d'acide chlorogénique " puriss FLUKA " , qu'elle est un artéfact (*) . La libération d'acide caféique a été confirmée par cochromatographie sur couche mince de cellulose MN 300 avant et après isomérisation trans → cis , par irradiation sous proche ultraviolet . Ce dernier résultat est encore confirmé par hydrolyse enzymatique au moyen de la rapidase (figure 15) . Il nous a donc paru raisonnable de supposer que les mélosides 1 et a sont probablement des esters caféiques du méloside L . Compte-tenu des très faibles quantités que nous avons pu isoler , il n'a été possible d'étudier plus en détail que le seul méloside 1 . Nous avons cependant vérifié , auparavant , par chauffage ou irradiation de mélosides A et L purs déposés sur des feuilles de papier WHATMAN 3 MM , que les mélosides a et 1 ne sont pas des artéfacts dus à la dégradation de A et de L .

III - A - 2 - 5 - Structure du méloside 1

Compte-tenu de la présence dans 1 d'un noyau flavone et d'un groupement acide caféique , ainsi que de l'absorption importante de ces deux types de molécules dans le proche ultraviolet , il nous a semblé injustifié de caractériser cette molécule d'après les déplacements de son spectre d'absorption dans l'UV comme nous l'avons fait pour A et L . Nous avons cependant constaté que toutes les propriétés spectroscopiques du méloside 1 , mises en évidence par ces 5 réactions sont très voisines de celles de L (figure 8) . Un tel résultat pourrait indiquer que l'absorption du groupement flavone L , du méloside 1 n'est pas perturbée par la présence d'acide caféique . Il ne semble donc pas y avoir d'interaction directe par conjugaison entre ces deux fonctions . Ainsi l'acide caféique serait fixé non sur le cycle flavone , mais sur la partie osidique de L .

Pour étayer cette hypothèse , nous avons recherché , par chromatographie et après hydrolyse acide , l'existence d'un ester de type caféyl-glucose parmi les produits intermédiaires d'hydrolyse de 1 . Nous n'avons pas observé la formation de quantités importantes de dérivés de ce type dont les propriétés ont été décrites par ailleurs (BIRKOFFER et al. 1960 - ASEN et EMSWELLER , 1962) . D'autre part , faute de composé de référence ,

---

(*) artéfact dû vraisemblablement à l'oxydation de l'acide caféique , puis à l'hydroxylation en 6 de la quinone correspondante , suivie de lactonisation de l'acide 3,4,6-trihydroxycinnamique ainsi formé .

il n'a pas été possible de rechercher cet ester parmi les produits formés à l'état de traces . Par contre , dans tous les cas , nous avons pu isoler , par séparation préparative sur cellulose , puis caractériser sans ambiguité , l'acide trans-caféique comme produit final d'hydrolyse du méloside 1 par :

- 1 - extraction et partage préférentiel dans l'éther éthylique en présence d'eau en milieu acide (pH 1) et dans l'eau en milieu alcalin (pH 8) ;

- 2 - isomérisation trans → cis sous ultraviolet proche et séparation après chromatographie sur cellulose MN 300 dans l'acide acétique aqueux à 10% des isomères trans (R_F = 0,37) et cis (R_F = 0,70) ;

- 3 - spectre d'absorption dans le méthanol (maximum principal à 323 nm , secondaire à 294 nm et minimum vers 270 nm) et déplacement hyperchrome du maximum principal à 340 nm en milieu alcalin .

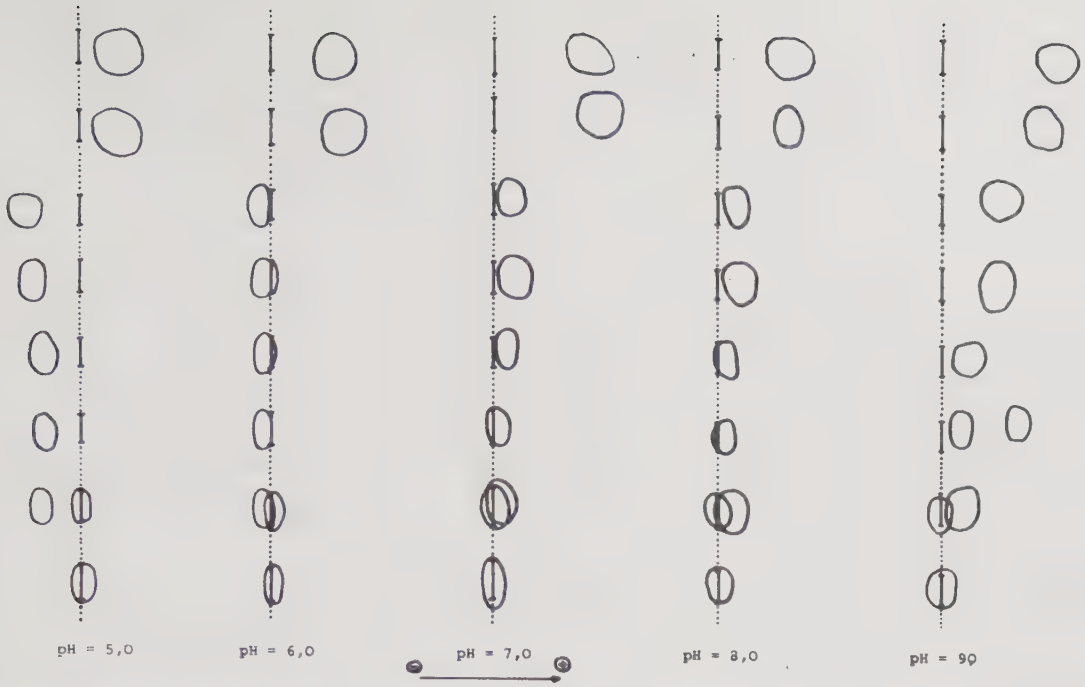
Cherchant alors à établir si , dans le méloside 1 , la liaison entre l'acide trans-caféique et le méloside b est de type ester ; nous avons étudié les spectres infrarouges des mélosides et des produits de référence ; les résultats sont présentés sur la figure 15 . On remarque sur ces spectres que la bande des esters que nous avons observée , par ailleurs , à 1740 cm^{-1} (palmitate de méthyle) , à 1730 cm^{-1} (benzoate de phényle) , à 1720 cm^{-1} (benzoate de méthyle) et à 1710 cm^{-1} (cinnamate d'éthyle) n'existe ni dans les mélosides A et b , ce qui confirme les structures proposées , ni dans les mélosides a et 1 . Dans le cas particulier de 1 ce résultat est d'autant plus surprenant que les autres propriétés de 1 semblent être celles d'un ester , Il paraît peu vraisemblable qu'un effet de conjugaison intramoléculaire soit suffisant , compte-tenu des déplacements rapportés plus haut , pour déplacer la bande des esters jusqu'à celle du carbonyle des flavones (1650 cm^{-1}) . Cependant , il convient de remarquer que , dans le spectre infrarouge du tiliroside publié par HORHAMMER et al. (1961) et , dont la structure exacte a été établie par HARBORNE (1964) comme étant du 3-p-coumaryl-glucosido-kaempférol , on n'observe pas non plus la bande caractéristique des esters vers 1740 cm^{-1} mais une seule bande à 1690 cm^{-1} . Compte-tenu de ces données , les seules de la bibliographie à notre connaissance , il nous paraît raisonnable de considérer la structure du méloside 1 comme étant : 6-C-caféyl-glucosido-glucosyl-lutéoline . Il convient, à ce propos de remarquer que la structure 3',4'-diphénol de type lutéoline commune aux mélosides b , 1 et semble-t-il au méloside a , est bien confirmé (figure 15) par la présence de " pics faibles " entre 800 et 850 cm^{-1} et surtout l'absence d'un " pic fort " au voisinage de 840 cm^{-1} qui est , lui , caractéristique des flavone-4-hydroxylées telles que le méloside A , l'apigénine et la saponarine (WAGNER , 1964) .

Il nous a semblé alors possible de caractériser l'état de l'acide caféique dans le méloside 1 par étude comparée de la migration des mélosides par électrophorèse sur couche mince . Dans un premier temps , nous avons comparé l'effet du pH , dans le même tampon , sur la migration des mélosides . Nous avons constaté (figure 16 A) que les mélosides ont entre pH 5,0 et 9,0 des comportements électrophorétiques très voisins . De plus , on a vérifié que la migration des acides caféiques et diméthoxycaféiques , due à l'ionisation du carboxyle est différente . On peut supposer que si le carboxyle de l'acide caféique du méloside 1 était ionisé, on observerait des différences entre les migrations des mélosides L et 1 ; comme ce n'est pas le cas , il paraît justifié de conclure que l'acide caféique est engagé dans 1 par sa fonction carboxyle et donc que sa fonction ortho-diphénol est libre . Pour vérifier ce dernier point , nous avons comparé les migrations de L et 1 à pH fixe cette fois , mais , dans des tampons différents capables de former des complexes ionisés avec les fonctions ortho-diphénol . Nous avons utilisé pour cela , en milieu alcalin , le tampon borate et en milieu acide , un tampon molybdate proposé par PRIDHAM (1959) , les résultats sont présentés (figure 16 B) . On constate que cette figure que les variations de migration (différence de migration relative) dans les tampons complexant des mélosides a et 1 sont supérieures à celles du méloside L et de la rutine prise comme référence , et intermédiaire entre celles de l'acide diméthoxy-caféique , qui ne peut former de complexe , et de l'acide caféique qui peut en former .

Ces résultats permettent donc de supposer que dans les mélosides 1 et a , la carboxyle de l'acide caféique n'est pas ionisable alors que la fonction ortho-diphénol qui peut former des complexes est libre . En conclusion il paraît raisonnable de conclure que le méloside 1 est un ester caféique du méloside L , résultat concordant avec les autres propriétés décrites plus haut .

Enfin , le méloside a semble être un composé voisin de 1 ; cependant on peut remarquer , tant sur la figure 16 A que lors de l'hydrolyse acide et enzymatique (figure 14) la présence parmi les produits séparés de deux taches de type flavone . Faute de quantité suffisante de produit , il n'a pas été possible d'identifier la tache qui ne correspond pas au méloside L. Il se pourrait donc que a soit une combinaison plus complexe que 1 ou plus fragile ou bien , l'hypothèse ne peut être axclue compte-tenu des difficultés déja rencontrées pour séparer les mélosides 2 à 2 , un mélange que nous n'avons pas pu séparer encore .

En résumé , il paraît justifié de conclure que les mélosides A et L sont des 6-C-glucosido-glucosyl dérivés de l'apigénine et de la lutéoline le méloside 1 est très certainement le résultat de l'estérification d'un glucose du méloside L par l'acide caféique . Quand au méloside a , sa structure , très voisine de celle de 1 , reste à préciser en détail .



A - Effet du pH sur la migration électrophorétique des mélosides

Charges de bas en haut : Quercétine (Qe) , Quercétine + Rutine (Ru) , mélosides a , l , L , A , acides trans diméthoxycaféique (d M Caf) et caféique (Caf) ; longueur du dépôt = 1 cm .

	Migration à pH 8,8			Migration à pH 5,0		
	Phosphate	Borate	δ	Phosphate	Molybdate	δ
Ru	+ 1,1	+ 2,6	1,4	- 0,6	+ 1,5	3,2
L	+ 1,7	+ 3,7	1,2	- 0,7	+ 0,6	1,8
l	+ 1,5	+ 4,6	2,1	- 0,5	+ 1,5	4,0
a	+ 1,1	+ 4,5	3,0	- 0,5	+ 1,5	4,0
d M Caf.	+ 1,6	+ 2,1	0,3	+ 0,2	+ 0,6	2,0
Caf.	+ 3,2	+ 7,9	1,5	+ 0,5	+ 5,0	9,0

B - Effet de la nature des tampons sur la migration des mélosides

Les migrations sont mesurées en cm et comptées positivement vers l'anode et négativement vers la cathode ; δ : différence de migration relative , par référence à celle en tampon phosphate .

- Tampon Borate = 19 g tétraborate de sodium/l
- Tampon Molybdate = molybdate d'ammonium à 1% ajusté à pH 5,0 par SO_4H_2 = $2 . 10^{-3}$ M .

Figure 16 - Comparaison des mélosides par électrophorèse sur couche mince de cellulose .

Couche mince - Cellulose MERCK P.E. , tension = 1 000 volts/20 cm , durée = 30 min.

Il convient d'ajouter , pour terminer , que la structure proposée sur la base de ces analyses chimiques , pour les mélosides A et L , a été confirmée par spectroscopie de masse , après perméthylation selon la technique de BOUILLANT et al. (1974) . Les analyses ont été faites dans le laboratoire du Professeur CHOPIN auquel nous avons fourni des échantillons des mélosides . Les spectres obtenus confirment les structures isomères de la saponarine (méloside A) et de la lutonarine (méloside L) , par la présence de pics moléculaires respectivement à 734 et 764 , correspondant aux formules $C_{37}\ O_{15}\ H_{50}$ et $C_{38}\ O_{16}\ H_{52}$, et par la présence de pics importants à 515 et 545 correspondant à la perte du glucose (m = 219) en liaison osidique .

III - B - Localisation et compartimentation dans les feuilles et chloroplastes .

Nous avons dans un premier temps recherché la présence de polyphénols dans les culots de chloroplastes isolés . Dans un second temps nous avons employé la méthode d'extraction progressive à l'aide de solvants pour montrer l'existence d'une compartimentation des polyphénols présents dans les feuilles et les préparations chloroplastiques . Enfin , nous avons dosé les polyphénols de ces différents compartiments .

III - B - 1 - Présence de polyphénols dans les chloroplastes d'Angiospermes .

Nous avons seulement recherché des flavonosides et des dérivés d'acides cinnamiques à cause de leur présence systématique dans les feuilles .

- Préparations chloroplastiques de Tomate -

La présence dans les feuilles de Tomate de flavonosides , en particulier de rutine , d'esters d'acides cinnamiques et d'acide chlorogénique est bien établie (MING-AU WU et BURREL , 1958 ; VAN BRAGT et al. 1965) ; c'est une des raisons pour lesquelles nous avons étudié des préparations chloroplastiques de Tomate .

Tout d'abord , nous avons recherché par spectroscopie l'existence dans les chloroplastes de pigments autres que les pigments liposolubles : chlorophylles , caroténoïdes , plastoquinones .

Pour cela , nous avons éliminé , par élution progressive sur colonne , ces pigments liposolubles à l'aide de solvants spécifiques comme l'acétone aqueuse à 80% , v/v (ARNON , 1949) ou l'éther de pétrole alcoolique (DEROCHE et COSTES , 1966 a) ou l'éther de pétrole à 2% de méthanol (v/v) . Après évaporation des extraits éthéropétroliques , nous avons constaté que les quantités de chlorophylles mesurées dans les deux cas et celle

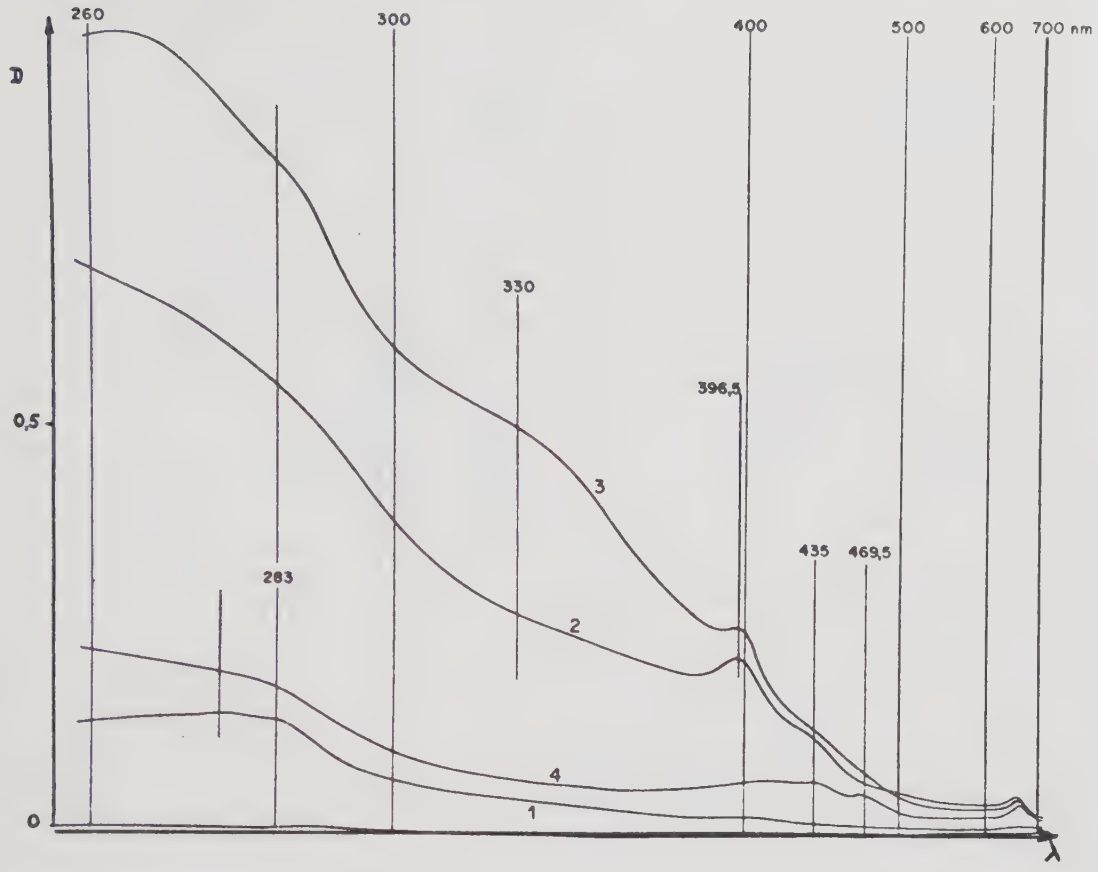


Figure 17 - Influence de la nature et de l'ordre des solvants sur le spectre des extraits méthanoliques des préparations chloroplastiques de Tomate .

(extraction progressive sur colonne de 50 mg de chloroplastes , extraits méthanoliques concentrés à 5 ml) .

Les numéros portés sur les spectres correspondent aux séquences suivantes :

- 1 - Acétone aqueuse (80%) - éther éthylique - méthanol
- 2 - Ether de pétrole à 2% méthanol - éther éthylique - eau - méthanol
- 3 - Ether de pétrole à 2% méthanol - éther éthylique - méthanol
- 4 - Extraction faite selon la séquence - 1 - mais par agitation dans les solvants puis récupération des chloroplastes par centrifugation .

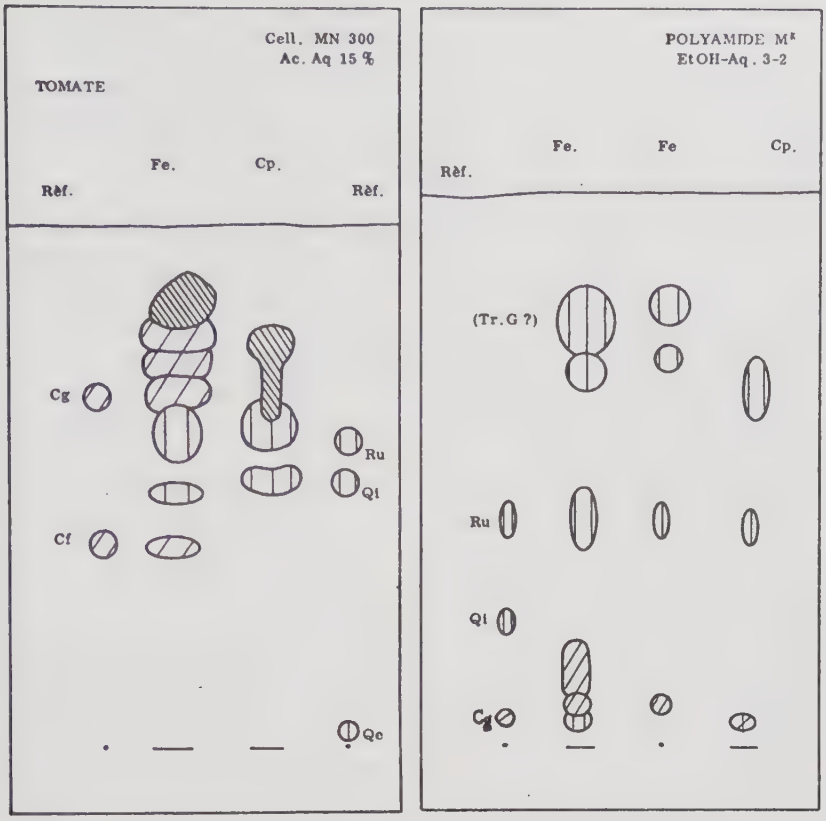


Figure 18 - Identification par chromatographie sur couche mince des polyphénols présents dans les éluats méthanoliques des préparations chloroplastiques de Tomate .

Abréviations : Fe = feuilles , Cp = Chloroplastes , Qe = quercétine , Qi = quercitrine , Ru = rutine , Cf = acide trans-caféique , Cg = acide trans-chlorogénique , TrG = flavonol triglycosides

Révélation : couleurs indiquées , selon le code de la figure 6 , mais après révélation par $AlCl_3$ et séchage à 100°C . Les couleurs correspondent aux fluorescences sous proche ultra-violet sauf pour les taches rougeâtres visibles seulement sur cellulose et qui masquent alors les dérivés des acides cinnamiques . Ces taches rougeâtres apparaissent d'autant plus nettement que le chauffage est prolongé; elles paraissent provenir de réaction de Maillard entre cellulose et substances azotées car elles réagissent positivement à la ninhydrine . La réaction n'a pas lieu sur polyamide .

dosée directement par la méthode d'ARNON (1949) sont égales . Nous avons ensuite recherché les pigments résiduels extractibles par le méthanol ou par l'eau acidifiée . Nous avons constaté (figure 17) qu'il existe dans les préparations chloroplastiques de Tomate des pigments absorbant entre 300 et 400 nm . Ces pigments sont solubles dans le méthanol , les solvants aqueux (eau , acétone à 80% ou acide acétique à 20%) , mais insolubles dans l'éther de pétrole à 2% de méthanol et l'éther éthylique .

Ces propriétés pouvant être celles de polyphénols , nous avons recherché ces substances par chromatographie dans ces extraits de chloroplastes . Nous avons alors observé , par chromatographie sur couche mince de cellulose et de polyamide (figure 18) la présence de polyphénols dans les extraits méthanoliques des préparations chloroplastiques . Nous avons identifié en particulier la rutine et l'acide chlorogénique par référence aux flavonoïdes des feuilles et à des corps purs . Il est remarquable que certains composés présents dans les feuilles ne sont pas détectables dans les extraits de chloroplastes . Ce résultat est particulièrement net pour les flavonosides qui ont des R_F élevés sur couche de polyamide . Compte-tenu des propriétés résolutives des polyamides en fonction du nombre d'oses fixés sur les flavonoïdes (RANDERATH , 1971) , ces flavonoïdes pourraient être des triglycosides de flavonols . Quoiqu'il en soit , ce premier ensemble de résultats permet d'affirmer que les préparations chloroplastiques de Tomate contiennent des polyphénols dans des proportions différentes cependant de celles que l'on trouve dans les feuilles entières .

Nous avons confirmé ces résultats par observation microscopique des culots de chloroplastes en fluorescence sous ultra-violet . Nous avons vérifié que les chloroplastes isolés ne sont pas systématiquement contaminés de débris de feuilles . Pour révéler les flavonoïdes nous avons choisi comme réactif le chlorure d'aluminium selon DELAVEAU (1968) . Comme cependant , ce réactif est susceptible de réagir avec certains caroténoïdes (MONTIES et COSTES , 1968) et les chlorophylles (MONTIES , 1968) , il ne nous a semblé justifié de l'utiliser seulement après avoir éliminé ces pigments . C'est la raison pour laquelle nous avons analysé des culots lyophilisés . Nous avons constaté que ces chloroplastes , verts sous lumière blanche , fluorescent en rouge sous proche ultra-violet . Ces mêmes chloroplastes , lavés par l'éther de pétrole à 2% de méthanol , sont jaunâtres sous lumière visible et fluorescent légèrement en jaune sous ultraviolet . Par contre , après traitement au chlorure d'aluminium , on observe une nette fluorescence jaune sous ultra-violet , caractéristique des flavonoïdes . Dans les mêmes conditions , on a observé que les culots lavés se colorent en orange pâle avec l'acétate neutre de plomb et que leur fluorescence est alors orangé-jaun

Ces réactions colorées peuvent aussi être observées directement sur des préparations chloroplastiques placées en couche mince sur une plaque à godet . D'après les données de GUILLERMOND et GAUTHERET (1933) et de DELAVEAU (1968) , toutes ces observations confirment l'existence de flavonosides dans les préparations chloroplastiques de Tomate .

Nous avons enfin vérifié que la présence de polyphénols dans ces préparations n'est pas un artéfact dû à une adsorption lors de l'isolement des chloroplastes . En raison de l'insolubilité générale des polyphénols dans les solvants apolaires riches en éther de pétrole , nous avons renoncé à isoler les chloroplastes en ces milieux non aqueux , dans lesquels les processus d'adsorption sur les protéines sont certainement favorisés . La présence d'anthocyanes , rapportée par STOCKING (1959) , comme contaminants cytoplasmiques des chloroplastes d'Achyranthes isolés en milieu non aqueux confirme cette hypothèse . Nous avons donc isolé les chloroplastes en milieux aqueux , bien que la perte , par ces chloroplastes , d'environ 50% de leurs protéines en cours d'isolement (HEBER , 1960) conduise à supposer une perte concomitante des polyphénols présents dans ces chloroplastes . De plus , nous avons ajouté au tampon d'isolement aucun constituant protéique capable de perturber les associations polyphénols-protéines susceptibles d'exister in vivo . En conséquence , nous avons cherché à mettre en évidence une adsorption éventuelle des polyphénols en ajoutant au tampon d'isolement des polyphénols présents dans les feuilles . Nous avons choisi d'ajouter de la rutine qui est à la fois moins soluble dans l'eau , plus facilement adsorbée et plus aisée à détecter que l'acide chlorogénique. Nous avons donc isolé les chloroplastes d'un lot homogène de feuilles après broyage soit dans du tampon saccharose ordinaire , soit dans ce même tampon supplémenté d'une quantité de rutine équivalente à celle contenue par les feuilles . Nous avons ensuite isolé les polyphénols de ces préparations par élution progressive et estimé la rutine par spectroscopie et chromatographie . Les modalités et résultats de ces analyses sont présentés sur la figure 19 . Nous avons constaté que la forme globale des spectres et les quantités de rutine extraites ne varient pas de façon significative après addition de rutine au milieu de broyage . Ces résultats rendent donc très peu vraisemblable une adsorption non sélective des polyphénols sur les chloroplastes ; ils ne permettent pourtant pas d'exclure l'adsorption sélective d'une quantité limitée de polyphénols au cours de la préparation des chloroplastes . Ces premiers résultats étant obtenus , nous avons recherché la présence de polyphénols dans les préparations chloroplastiques de Melon .

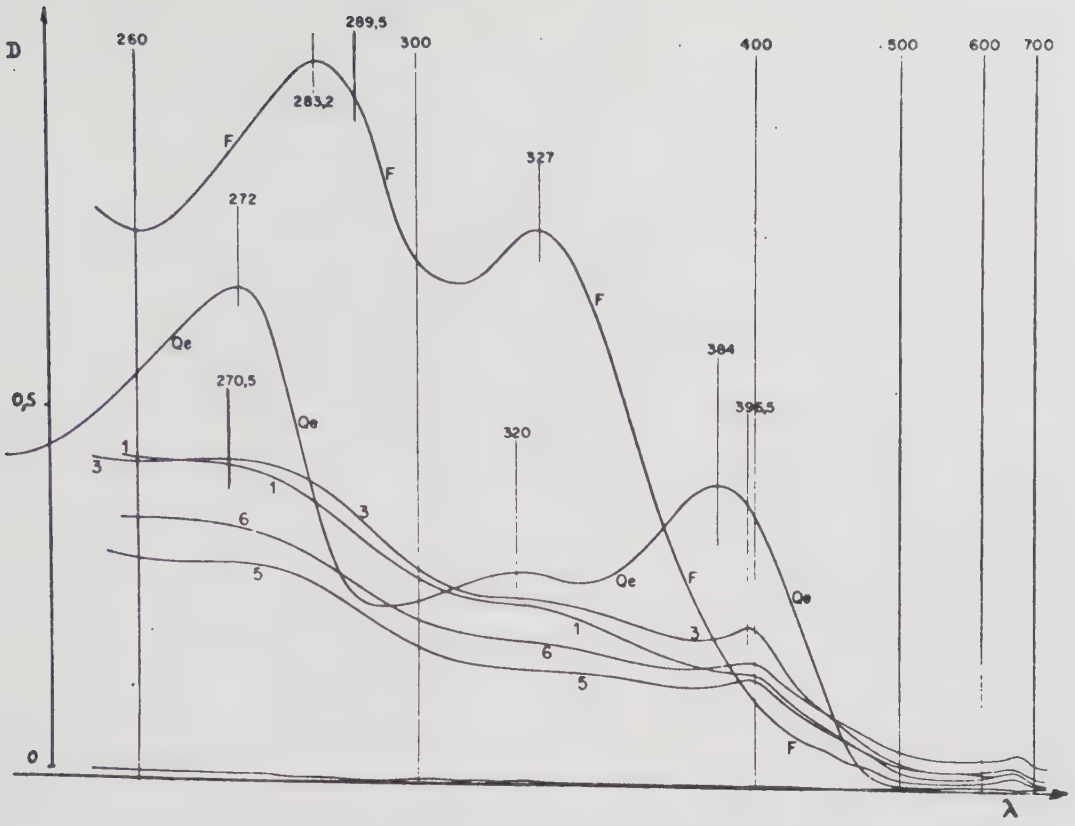


Figure 19 - Essai d'adsorption de rutine pendant l'isolement des chloroplastes de Tomate : spectre des extraits méthanoliques obtenus par élution progressive sur colonne après élution par le mélange éther de pétrole-méthanol et avant élution par l'eau .

F = extrait méthanolique de feuilles concentré à 5 ml , la quantité de feuilles analysée contenant une quantité de chlorophylle égale à celle des chloroplastes élués .

1,3,5,6 = extraits méthanoliques de préparations chloroplastiques (environ 50 mg) concentrés à 5ml après lavage par (1,5,6) le tampon d'isolement ou (3) l'eau . Dans les essais (5) et (6) le broyage des feuilles a été fait dans une solution tamponnée de Rutine (Qe) diluée au 1/2 par du tampon (5) ou non diluée (6) .

Qe = spectre de la solution tamponnée de Rutine utilisée pour le broyage lors des essais (5,6) (Dilution : 1/2) .
Nous avons vérifié , par chromatographie sur couche mince , que les teneurs en rutine des extraits méthanoliques et aqueux des préparations chloroplastiques isolées en présence de rutine ne sont pas supérieures à celles des extraits des préparations témoins .

- Préparations chloroplastiques de Melon -

Les recherches chez le Melon ont été particulièrement simplifiées par le fait que les quatre mélosides décrits précédemment constituent la plus grande partie des polyphénols solubles des feuilles de Melon ; nous nous sommes donc limités à rechercher ces mélosides dans les préparations chloroplastiques de Melon .

Dans un premier temps nous avons utilisé des préparations lyophilisées que nous avons extraites au Soxhlet . Nous avons analysé particulièrement l'extrait méthanolique concentré et lavé par l'éther éthylique . Nous avons , tout d'abord ,.comparé le spectre d'absorption de cet extrait (figure 20) avec celui des mélosides extraits des feuilles (figure 7). La forme de ce spectre , et , l'importance de son déplacement spectral , sont tout à fait comparables à celles des mélosides purifiés (figure 8). Nous pouvons donc affirmer que les préparations chloroplastiques de Melon , comme celles de Tomate , contiennent des pigments polyphénoliques .

Les données de la figure 20 permettent de plus d'estimer , semi-quantitativement , la teneur en mélosides de ces chloroplastes . Compte-tenu du fait que les deux principaux mélosides sont des flavone-di-osides de poids moléculaire (M) voisin de celui de la rutine , et que le coefficient d'absorption molaire ($\mathcal{E}$) de la rutine est , lui même,voisin de celui des C-glycosyl-flavones trouvées dans les mélosides , nous avons exprimé la teneur des chloroplastes de Melon en rutine . Sur la base de $\mathcal{E}$ = 19100 et M = 610 , on trouve ainsi une teneur de l'ordre de 200 µg par gramme de préparation chloroplastique lyophilisée , soit , compte-tenu de la teneur en chlorophylle des chloroplastes calculée d'après ARNON (1949) , une teneur de l'ordre de 2 µg . mg^{-1} Chl .

Ces premiers résultats étant acquis , nous avons vérifié que les préparations chloroplastiques de Melon contiennent bien un mélange des quatre mélosides . Pour cela nous avons identifié , par chromatographie analytique sur couche mince de cellulose , ces mélosides ainsi que leurs produits d'hydrolyse acide . Les résultats de ces analyses sont présentés sur la figure 21 . On reconnait sur cette figure au début de l'hydrolyse (0 mn) , les trois taches des mélosides , respectivement A au niveau de l'acide caféique (Cf) , le mélange non résolu de a et de l au niveau de la rutine (Ru) et , entre les deux , la tache du méloside L . Nous avons confirmé l'identification des mélosides à l'aide de leurs réactions colorées spécifiques et par cochromatographie sur couches minces avec les

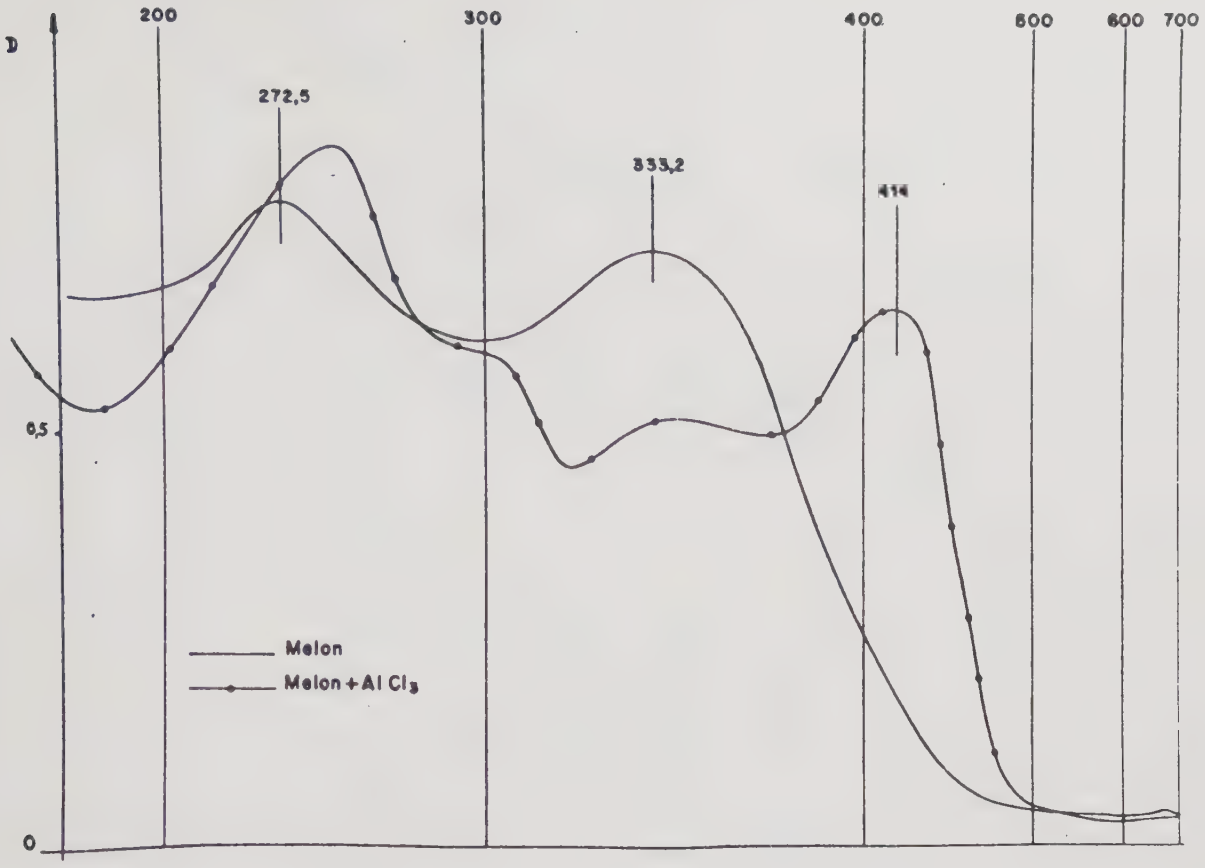


Figure 20 - Spectre de l'extrait méthanolique de préparations chloroplastiques de Melon et déplacement spectral en présence de $AlCl_3$.

Les chloroplastes , isolés en tampon phosphate ne contenant aucun additif (paragraphe II - 2 - 2) , ont été ensuite extraits , au Soxlhet , par le mélange éther de pétrole-méthanol puis par le méthanol . L'extrait méthanolique concentré juste à sec a été lavé par l'éther éthylique puis repris dans 10 ml , il correspond à 1 g de chloroplastes secs . Déplacement spectral après réaction, selon le protocole standard .

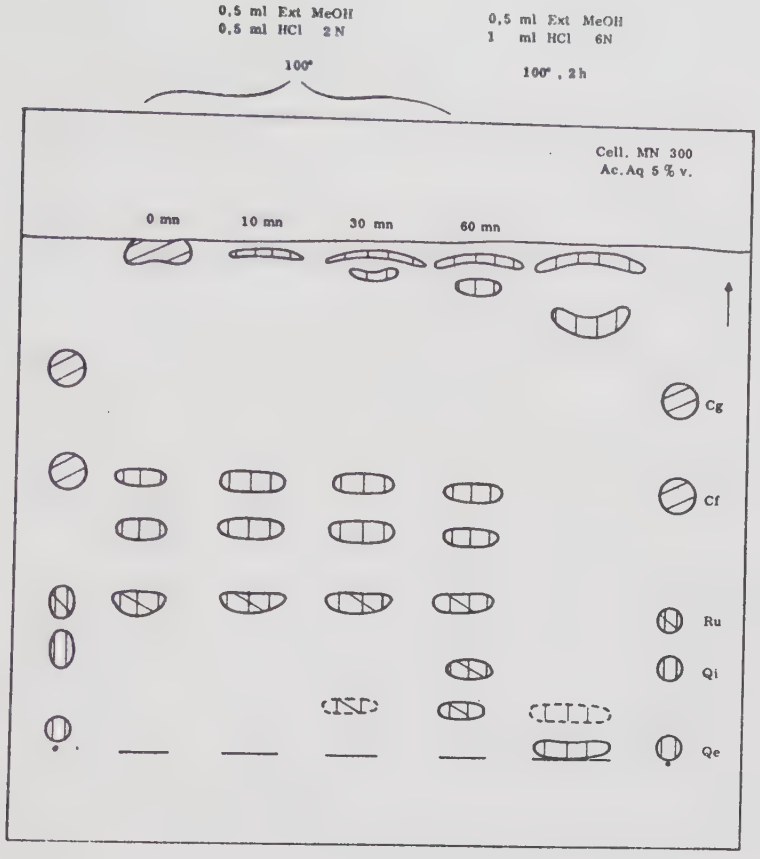


Figure 21 - <u>Séparation des mélosides présents dans les préparations chloroplastiques de Melon ainsi que de leurs produits d'hydrolyse acide</u> (extraits méthanoliques)

- Conditions et durée d'hydrolyse : en haut de la figure
- Couleurs : selon le code de la figure 6 après révélation par $AlCl_3$
- Abréviations : voir figure 18

mélosides extraits des feuilles entières . Nous avons vérifié que les mélosides des préparations chloroplastiques sont hydrolysées en milieu acide comme ceux des feuilles avec formation d'isovitexine et d'isoorientine . En 1969 , nous avons montré le caractère hydrolysable des flavonosides de ces préparations (MONTIES , 1969) . Nous n'avions pu cependant , distinguer les produits d'hydrolyse des produits de dégradation des mélosides , telles les substances X (figure 11) , en partie à cause de l'emploi comme solvant de l'acide acétique à 5% (figure 21) qui n'est pas assez résolutif pour les substances de R_F faible telles que la vitexine et l'orientine (tableau 6) . Cependant , les résultats des hydrolyses acides des mélosides extraits des feuilles et des préparations chloroplastiques sont suffisamment concordants pour que l'on puisse conclure que ces préparations contiennent les mêmes mélosides que ceux qui ont été caractérisés dans les feuilles entières .

Ce premier résultat étant obtenu , nous avons vérifié comme dans le cas de la Tomate que la présence de mélosides dans les préparations chloroplastiques n'est pas un artéfact d'adsorption lors de l'isolement des organites . Ensuite , nous avons vérifié que le lavage des culots chloroplastiques , nécessaire pour éviter les contaminations d'origine cytoplasmique , est une précaution suffisante .

Dans un premier temps , pour vérifier l'absence d'adsorption des mélosides sur les chloroplastes , nous avons réalisé des expériences d'incubation de chloroplastes de Melon dans des milieux contenant des quantités différentes de mélosides ou de rutine .

Pour cela , après avoir éliminé les pigments liposolubles d'un lot de feuilles de Melon , nous avons isolé la totalité de ses mélosides , directement avec de l'eau . Nous avons ainsi préparé , après dilution , un extrait aqueux deux fois plus concentré en mélosides que le broyat de feuilles dont nous avons ensuite isolé les chloroplastes employés pour les essais d'adsorption .

Lors des essais d'adsorption , les culots chloroplastiques , isolés à partir de parties aliquotes du broyat de feuilles ont été dispersés soit dans du tampon de lavage , soit dans de l'eau , soit dans de l'extrait de méloside préparé précédemment dilué,au demi par du tampon ou par de l'eau . Les chloroplastes ont été ensuite isolés et analysés par extraction progressive sur colonne . Nous avons enfin comparé les spectres d'absorption des extraits de ces quatre séries de chloroplastes .

Nous avons invariablement constaté que les spectres des extraits méthanoliques et aqueux des quatre séries ainsi définies sont toujours extrêmement voisins . Les résultats obtenus sont tout à fait comparables à ceux obtenus lors des essais d'adsorption de rutine sur les chloroplaste

de Tomate (spectre 1 , 3 , 5 , 6 de la figure 19) . Nous avons présenté les résultats de deux expériences dans le tableau 8 . Compte-tenu de la similitude de forme des spectres , nous avons seulement rapporté les densités optiques des extraits aqueux et méthanoliques à 335 nm . Ces résultats permettent de constater que , les quantités de chlorophylles présentes dans chaque série d'essai sont très voisines . De même , les quantités de mélosides contenues dans les extraits méthanoliques et aqueux ne sont pas significativement différentes .

Enfin , lors d'essais identiques à ceux faits sur Tomate (figure 19) , nous n'avons pu mettre en évidence , après chromatographie , la présence de rutine dans les extraits de préparations chloroplastiques de Melon isolées dans du tampon supplémenté en rutine . Ces résultats , joints aux précédents permettent d'exclure une adsorption non spécifique sur les chloroplastes de quantités de polyphénols variables avec la concentration du milieu d'extraction . De plus les derniers résultats rendent peu vraisemblable une adsorption spécifique en quantité limitée . Il parait donc raisonnable de conclure que les polyphénols extraits des préparations chloroplastiques sont bien présents dans les chloroplastes .

Très récemment , WEISSENBOCK et SCHNEIDER (1974) ont obtenus sur des culots de chloroplastes de feuilles d'Avoine (Avena sativa L.) des résultats analogues qui confirment avec les conclusions précédentes .

Dans un second temps , nous avons cherché à préciser l'importance des opérations de lavage sur les teneurs en polyphénols des culots chloroplastiques . Pour cela nous avons comparé par spectrophotométrie (figure 22) les spectres d'absorption du broyat de feuilles de Melon filtré (CS) contenant les chloroplastes , du surnageant (S) de centrifugation qui correspond au broyat ne contenant plus de chloroplastes , du surnageant de lavage (L) obtenu après remise en suspension du culot chloroplastique et enfin , de l'extrait éthéropétrolique (Cp) de la préparation chloroplastique obtenue .

En comparant les spectres du broyat (CS) avec celui du surnageant (S) on constate que la sédimentation des chloroplastes a pour effet de diminuer l'importance des bandes d'absorption des pigments liposolubles des chloroplastes (Cp) . En effet on reconnait sur le spectre (Cp) des seuls pigments liposolubles des chloroplastes , les maximums caractéristiques des chlorophylles et caroténoïdes . De même , on reconnait sur le spectre (S) les deux maximums caractéristiques de mélosides vers 270 et 335 nm (figure 7) dont l'absorption n'est pratiquement pas modifiée par la présence de pigments liposolubles résiduels . Si maintenant on compare le spectre du surnageant de lavage (L) aux deux précédents , on constate que sa

Tableau 8 - DENSITE OPTIQUE DES EXTRAITS DE CHLOROPLASTES DE MELON AYANT SUBI DIFFERENTS LAVAGES

Les culots chloroplastiques , correspondant à des parties aliquotes du même broyat de feuilles , ont été remis en suspension à 4°C pendant 20 minutes dans le même volume des milieux suivants :

- T - tampon d'isolement ;
- A - eau distillée ;
- TF - solution aqueuse de méloside diluée au 1/2 par T ;
- AF - solution aqueuse de méloside diluée au 1/2 par A .

Ces culots ont été reprécipités , lavés et lyophilisés , puis 50 mg secs ont été analysés par extraction progressive sur colonne . Nous avons rapporté les densités optiques à 663 nm des chlorophylles dans 400 ml de l'extrait éther de pétrole-méthanol à 2% ainsi que celle , à 335 nm , des extraits méthanoliques (Me) et aqueux (Aq) éventuellement concentrés au volume indiqué . Les résultats correspondent à deux séries indépendantes d'expériences .

Première expérience	T	A	TF	AF
Chlorophylles (663 nm)	0,42	0,39	0,41	0,35
Extrait Me (10 ml)	0,21	0,27	0,12	0,13
Extrait Aq (100 ml)	0,02	0,02	0,02	0,02

Seconde expérience	T	A	TF	AF
Chlorophylles (663 nm)	0,27	0,25	0,22	0,29
Extrait Me (10 ml)	0,39	0,24	0,24	0,20
Extrait Aq (10 ml)	0,56	0,52	0,42	0,43

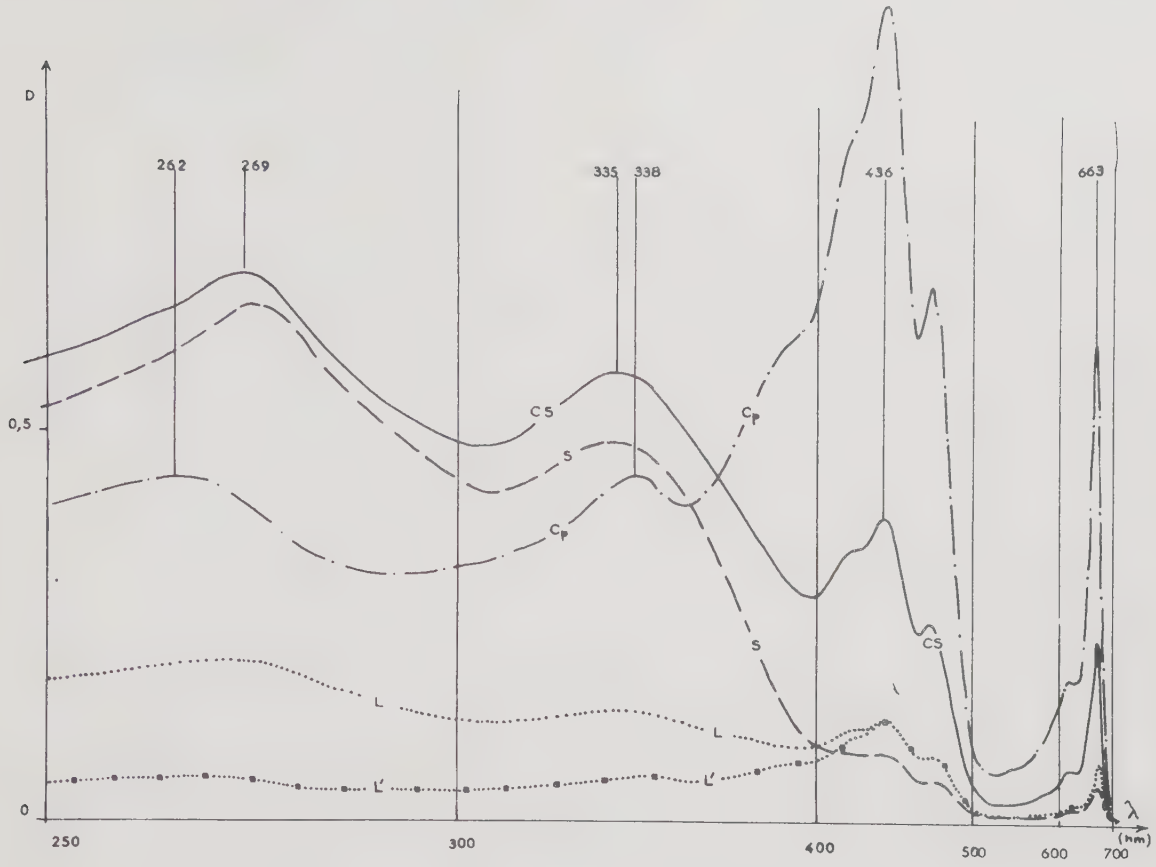


Figure 22 - Comparaison spectrophotométrique du surnageant de lavage (L) avec le broyat de feuille (CS) le surnageant d'isolement (S) et les pigments liposolubles des chloroplastes (Cp) . La préparation chloroplastique (250 mg secs) a été extraite de 23 g de feuilles . Après broyage dans 115 ml de tampon et filtration , on obtient (CS) . Après la première centrifugation on obtient le surnageant (S) et le culot chloroplastique qui est remis en suspension dans 100 ml de tampon . Après la seconde centrifugation on obtient le surnageant (L) et les chloroplastes .

Les pigments de(CS),(S),(L)extraits dans l'acétone à 80% ont été repris , après évaporation , dans le méthanol ;(CS)et(S)ont été dilués au 1/40ième ,(L)n'est pas dilué .

Les pigments lipidiques chloroplastiques ont été extraits par le mélange éther de pétrole-méthanol à 2% , une partie aliquote reprise dans le méthanol (Cp) à été diluée (L') pour donner une densité optique,à 436 nm , égale à celle du surnageant de lavage .

forme est voisine de celle de (S) entre 250 et 400 nm et de celle de (Cp) entre 400 et 700 nm . Pour permettre une comparaison plus aisée , nous avons rapporté sur la figure 22 le spectre (L') qui correspond à une dilution de l'extrait (Cp) , telle que les spectres (L) et (L') aient la même densité optique à 435 nm . Il est évident que la différence d'adsorption que l'on observe entre L et L' dans la seule bande du spectre comprise entre 250 et 400 nm ne peut être attribuée qu'aux seuls polyphénols .

Les polyphénols responsables de cette différence d'adsorption sont donc les polyphénols éliminés par lavage du culot chloroplastique . Pour tenter de déterminer l'origine de ces polyphénols , nous avons , par le calcul , comparé la quantité de mélosides présents dans le surnageant (L) et dans la fraction de surnageant (S) imbibant le culot . Nous avons estimé le volume de surnageant imbibant les chloroplastes à 0,1 ml pour 100 mg de chloroplastes secs . La mesure a été faite par gravimétrie après imbibition de chloroplastes lyophilisés , la valeur trouvée est voisine de celle obtenue par d'autres méthodes (RYBKINA et al. 1972) . Compte-tenu de la densité optique du surnageant (S) , du volume de ce surnageant imbibant les chloroplastes avant lavage , de la densité optique du surnageant (L) et des volumes et dilutions indiquées sur la figure 22 nous avons constaté que la quantité de polyphénols éliminée par le lavage correspond à celle contenue dans le volume de (S) imbibant les chloroplastes . Ce premier résultat , bien que semi-quantitatif , confirme donc bien la nécessité du lavage des culots chloroplastiques .

Après avoir exclu la possibilité d'une contamination des chloroplastes par les polyphénols contenus dans le surnageant (S) , nous avons cherché à estimer l'importance de la contamination due cette fois aux polyphénols contenus dans le volume du surnageant (L) imbibant le culot , cette fois , après lavage .

Pour cela nous avons comparé les quantités de polyphénols extraites des chloroplastes avec celles contenues dans le volume de (L) qui imbibe ces chloroplastes . Nous avons simplement mesuré les densités optiques à 335 nm de ces extraits et nous avons constaté que la quantité de polyphénols contenus dans le volume de L imbibant le culot est au moins 100 fois inférieure à celle extraite des préparations chloroplastiques . La comparaison des données de la figure 22 avec celles du tableau 8 , par exemple , permet de vérifier ce résultat . L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure que le protocole de lavage employé suffit pour rendre quantitativement négligeables les contaminations des chloroplastes par les surnageants ; d'autre part , ce protocole réduit au minimum le nombre des opérations susceptibles de briser les chloroplastes au cours de leur isolement .

L'ensemble de ces résultats nous ayant conduit à penser que la présence de polyphénols dans les chloroplastes de Melon ou de Tomate ne résulte ni d'un artéfact d'adsorption ,ni d'une contamination due à un lavage incomplet des culots . Nous avons donc cherché à établir la généralité de cette conclusion en recherchant la présence de polyphénols dans les préparations chloroplastiques d'autres Angiospermes .

III - B - 1 - 3 - Préparations chloroplastiques d'autres Angiospermes .

Nous avons analysé les préparations chloroplastiques des autres Angiospermes de la même façon que celles de Tomate et de Melon : nous nous sommes limité à comparer par spectrophotométrie et chromatographie sur couche mince les extraits méthanoliques obtenus après élimination sur colonne des pigments liposolubles chloroplastiques .

Nous avons choisi quelques Angiospermes parce que certains de leurs polyphénols étaient connus : c'est le cas de la Capucine (Tropealum majus L. - DELAVEAU , 1967) , du Liseron (Convolvulus sepium L. - TRONCHET , 1966) du Haricot (Phaseolus vulgaris L. - MARSH , 1955) ; les autres , ont été choisies parce que elles en étaient éloignées phylogénétiquement : c'est le cas de l'Ortie (Urtica dioica L.) du Blé (Triticum vulgaris L. de la Luzerne (Medicago sativa L.) de la Berçe (Heracleum sphondylium L. du Maïs (Zea mays L.) et de la Laitue (Lactuca sativa L.)(CHADEFAUD et EMBERGER , 1960) . Toutes ces plantes ont été récoltées après croissance en plein champ et en été .

Sur la figure 23 , nous avons présenté les spectres d'absorption des extraits méthanoliques de ces préparations . Il est remarquable que tous ces extraits présentent une intense absorption entre 300 et 400 nm , en particulier l'absorption vers 320 et 350 nm peut être attribuée à des dérivés d'acides cinnamiques et de flavonoïdes . Sur cette figure , nous n'avons pas représenté les spectres des extraits de chloroplastes de Tomate et de Melon qui sont très voisins de ceux de Laitue . Il suffit de se reporter aux spectres des extraits de chloroplastes de Tomate (figure 19) et aux densités optiques (tableau 8) concernant le Melon pour vérifier la ressemblance qualitative et quantitative de ces trois extraits .

Il convient de remarquer l'existence , dans plusieurs de ces extraits, d'un net maximum vers 400 nm que nous avons observé aussi dans ceux de Tomate (figure 19) et dans ceux de Melon , mais dont l'origine est inconnue. Il pourrait s'agir de produits de dégradation de pigments liposolubles plutôt solubles dans le méthanol ; il convient de remarquer que WEBER (1963 a observé que " la protéine structurale solubilisée " des chloroplastes

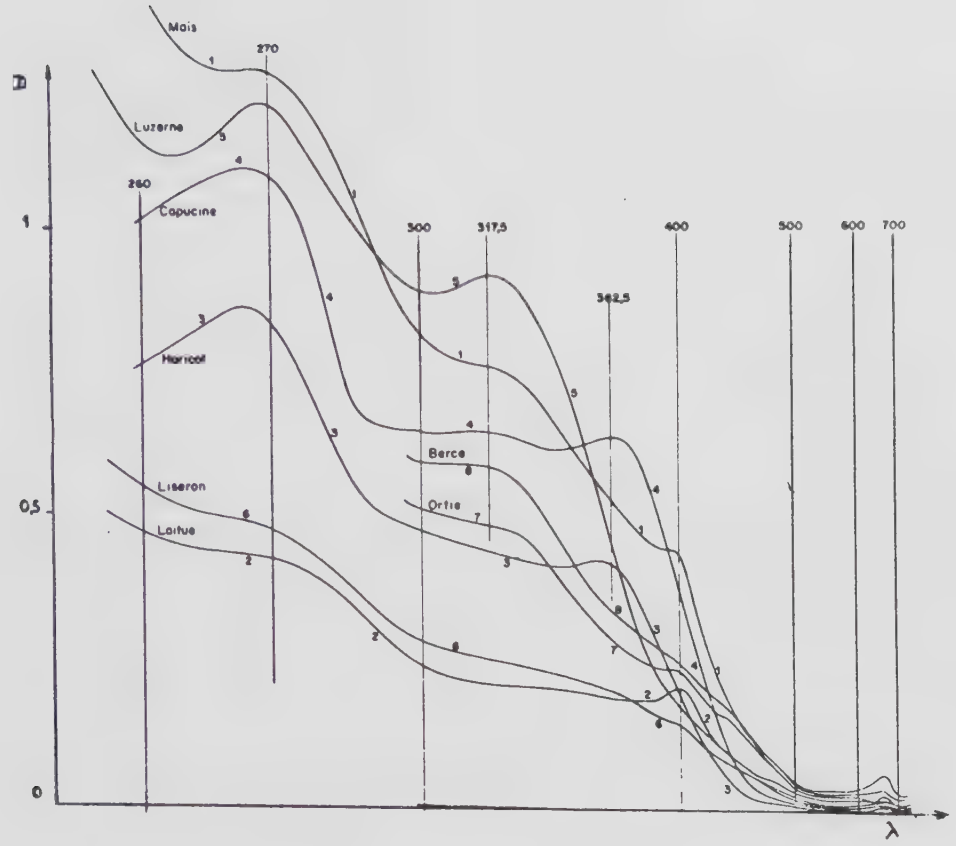


Figure 23 - Spectre d'absorption des éluats méthanoliques de préparations chloroplastiques d'Angiospermes .

Les extraits d'environ 100 mg de chloroplastes ont été concentrés dans 10 ml ; les spectres des extraits de chloroplastes de Melon et de Tomate, très voisins par leur forme de celui de la Laitue, n'ont pas été représentés .

d'Antirrhinum majus , présente aussi aux environs de 400 nm un maximum tout à fait comparable .

Quoiqu'il en soit , la forme des spectres des extraits méthanoliques de chloroplastes est compatible avec la présence de polyphénols dans ces organites . Nous avons donc confirmé cette hypothèse par chromatographie sur couche mince à l'aide des réactions colorées caractéristiques . Nous avons observé , dans tous les cas , la présence de quantités variées de dérivés d'acides cinnamiques et de flavonoïdes . Ces résultats nous ont conduit à conclure à la présence systématique de polyphénols dans les chloroplastes d'Angiospermes (MONTIES , 1969) . Depuis ce résultat a été confirmé : la présence de dérivés d'acides cinnamiques et de flavonosides ont été rapportés dans les chloroplastes d'Epinard (Spinacea oleacera) par OETTMEIER et HEUPEL (1972 a , 1972 b) , dans ceux d'Impatiente (Impatiens balsamina) par WEISSENBOCK (1971) et dans les chloroplastes et étioplastes d'Avoine (Avena sativa) par WEISSENBOCK et al. (1972) , WEISSENBOCK (1973) puis WEISSENBOCK et SCHNEIDER (1974) .

L'emploi de chloroplastes d'Epinard étant très fréquent dans les études de photosynthèse , nous avons alors choisi de préparer des chloroplastes isolés d'Epinard achetés que le marché local , afin de montrer l'effet de conditions différentes d'isolement des chloroplastes sur leurs teneurs en polyphénols .

Les chloroplastes étant susceptibles de perdre leur stroma lors de lavages en milieu hypotonique , nous avons recherché les polyphénols dans les préparations chloroplastiques isolées en milieu hypertonique , puis lavées éventuellement en milieu hypotonique . Pour cela,nous avons isolé des chloroplastes d'Epinard dans les conditions ordinaires et nous avons lavé une partie aliquote du culot chloroplastique par de l'eau . Nous avons ensuite comparé les spectres d'absorption des pigments totaux contenus dans les feuilles et les culots avant et après lavage . Les résultats de cette comparaison sont présentés sur la figure 24 . Pour faciliter la comparaison de ces extraits nous avons ajusté à la même valeur , leur densité optique à 663 nm . On reconnait sur le spectre (F) de feuilles entières d'Epinard les pics caractéristiques des pigments liposolubles entre 400 et 700 nm auxquels viennent se superposer ceux des polyphénols entre 250 et 400 nm . Ce résultat est tout à fait concordant avec celui déja obtenu avec les feuilles de Melon (figure 22) ; il permet de confirmer , par comparaison du spectre des feuilles et des pigments liposolubles , l'importance considérable des polyphénols comme pigment absorbant le proche ultraviolet . Nous avons fait des observations tout à fait analogues avec les feuilles de Melon (figure 22) , de Tomate et de Blé , et de ce fait il est raisonnable de conclure que les polyphénols sont les principaux pigments

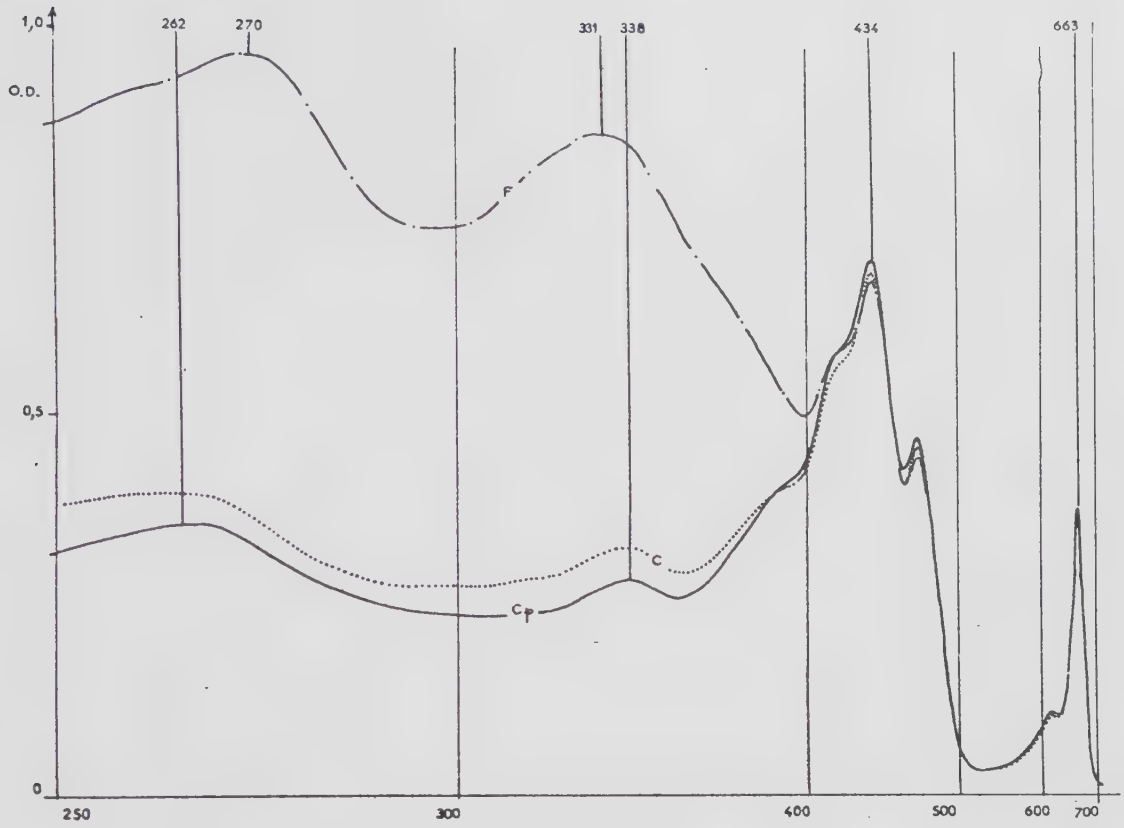


Figure 24 - Spectre d'absorption des pigments totaux de feuilles entières (F) d'Epinard et des préparations chloroplastiques non lavées (C) et lavées (Cp) à l'eau .

Les chloroplastes ont été isolés , selon le protocole standard , des feuilles (F) ; une partie aliquote du premier culot chloroplastique a été conservée pour analyse (C) alors qu'une autre partie a été lavée deux fois par l'eau (Cp) .

Les pigments totaux , extraits dans l'acétone aqueuse , à 80% , ont été repris après évaporation dans le méthanol et ajustés à la même densité optique à 663 nm .

foliaires absorbant dans le proche ultraviolet .

Si maintenant nous comparons les spectres (Cp) et (C) des culots chloroplastiques lavés et non lavés , on constate qu'il existe une différence systématique d'absorption entre 250 et 400 nm . Il est évident que cette différence doit être attribuée aux polyphénols éliminés par lavage des culots chloroplastiques ; ce résultat confirme tout à fait celui , déja obtenu , lors du lavage des culots de chloroplastes de Melon (figure 22) . Il nous paraît donc raisonnable d'affirmer que les quantités de polyphénols contenues dans les préparations chloroplastiques peuvent varier de façon considérable en fonction des modalités de lavage des culots . En effet , nous avons invariablement constaté que , même après deux lavages par l'eau , il est encore possible de mettre en évidence par chromatographie sur couche mince , la présence de polyphénols dans les extraits de " débris de chloroplastes " ainsi obtenus . Il convient de remarquer que cette conclusion est aussi valable pour les chloroplastes de Melon isolés dans du tampon pur (figure 20) .

Il est donc possible d'affirmer que le lavage des chloroplastes et leur éclatement , en milieu hypotonique , a pour effet de faire varier de façon considérable la teneur des culots chloroplastiques en polyphénols . Dans l'expérience faite sur chloroplastes d'Epinard (figure 24) , la quantité de polyphénols ainsi éliminée et équivalente à 1 µg de rutine par mg de chlorophylle .

Il convient d'insister cependant sur le fait que même après deux lavages en milieu hypotonique il reste encore des polyphénols dans les culots de chloroplastes éclatés .

A la suite des observations de BERKALOFF et DEROCHE (1971) qui ont montré par microscopie électronique que des chloroplastes de Blé , isolés dans des conditions très voisines , ont perdu leur enveloppe et leur stroma , il paraît raisonnable de supposer que les polyphénols trouvés dans les chloroplastes lavés en milieu hypotonique sont liés à leurs thylakoïdes . Cependant , dans tous ces essais , ainsi que dans ceux réalisés sur les chloroplastes de Tomate (figure 19) , que de Melon (figure 21) nous avons toujours observé que le lavage des culots chloroplastiques entraine une diminution sensible de la teneur des chloroplastes en polyphénols sans jamais provoquer leur élimination complète . Ces résultats permettent de supposer que les polyphénols extractibles de chloroplastes lavés en milieu hypotonique proviennent , soit de leurs thylakoïdes , soit de résidus de stroma contaminant encore les thylakoïdes ; il nous parait pour le moment impossible de faire un choix entre ces deux hypothèses .

L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer qu'il existe systématiquement des polyphénols dans les préparations chloroplastiques d'Angiospermes et que , de plus , la présence de polyphénols dans les chloroplastes est très vraisemblable . On peut enfin remarquer qu'il est nécessaire d'utiliser successivement deux solvants , méthanol puis eau , pour extraire en totalité les polyphénols des préparations chloroplastiques . Ce phénomène traduit l'existence d'une compartimentation des polyphénols telle que nous l'avons définie précédemment (page 11) . Nous avons donc étudié ce phénomène pour tenter de préciser les conclusions précédentes .

III - B - 2 - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles et les préparations chloroplastiques .

Nous avons observé précédemment qu'il est nécessaire , lors de l'extraction préparative de feuilles de Melon au Soxhlet , d'utiliser le méthanol puis l'eau pour extraire en totalité les mélosides . Nous avons ensuite fait les mêmes observations sur des préparations chloroplastiques de Melon traitées tant au Soxhlet que par extraction progressive sur colonne (tableau 8) . Dans tous ces cas , nous avons mis à profit la solubilité différente des mélosides dans le méthanol et dans l'eau pour isoler deux compartiments correspondant aux polyphénols solubles dans le méthanol (forme Me) et dans l'eau (forme Aq) . C'est la raison pour laquelle nous avons commencé par étudier le phénomène de compartimentation des polyphénols du Melon .

III - B - 2 - 1 - Compartimentation dans les feuilles de Melon .

Pour étudier la compartimentation des polyphénols , nous avons utilisé la méthode d'extraction sur colonne sous pression et débit constant (figure 2) . Les pigments liposolubles sont extraits par le mélange éther de pétrole ou pentane contenant 2% de méthanol ; lorsque l'extraction est faite sur 50 mg de feuilles lyophilisées , seuls les 30 à 40 premiers ml de solvant écoulés sont colorés . Après élution par 100 ml du premier solvant , on constate en général qu'il ne reste plus de chlorophylles dans la poudre . Cependant dans le cas de feuilles jeunes , il reste souvent des quantités non négligeables de chlorophylles qu'il est possible d'extraire par l'éther éthylique . Les pigments liposolubles étant ainsi éliminés , le méthanol est utilisé comme troisième solvant.On constate alors

qu'après écoulement de 100 ml , le solvant d'extraction est incolore alors que , environ 90% des mélosides extractibles par le méthanol sont élués par les 50 premiers ml . Enfin l'eau est employée comme dernier solvant ; on constate que , après écoulement de 50 ml l'éluat est incolore alors que 90% des mélosides extractibles par l'eau sont extraits par les 25 premiers ml . Les spectres de ces différents extraits sont présentés sur la figure 25 ; on constate , tant après alcalinisation qu'après acidification , que les spectres des formes Aq et Me sont encore très peu différentes . Nous n'avons jamais observé , d'un échantillon à l'autre , de différences qualitatives entre les spectres de ces extraits , mais seulement des différences quantitatives dans l'importance relative des deux formes . Dans tous les cas , nous avons vérifié la présence dans les formes Me et Aq des quatre mélosides A , L , a et l que nous avons pu séparer (figure 26) sur couche mince de cellulose , grâce à la technique des migrations successives . Nous avons ensuite utilisé cette technique pour comparer les compositions relatives en mélosides des formes Me et Aq (figure 27) , et nous avons constaté que les proportions relatives de chacun des mélosides sont différentes dans les deux formes .

Ces premiers résultats étant acquis , nous avons cherché à préciser la variabilité de l'importance relative des formes Aq et Me d'un échantillon de feuilles donné . Tout d'abord , étant donnée la faible masse de matière sèche analysée (50 ou 100 mg le plus souvent) , nous avons constaté qu'il est nécessaire de broyer très finement l'échantillon pour avoir un échantillonnage représentatif dont les densités optiques des différents extraits (éther de pétrole - méthanol , méthanol , eau) ne diffèrent pas , en moyenne , de plus de 5% . Un tel résultat est bien conforme au fait que , dans l'épaisseur du limbe , les pigments ne sont pas répartis de façon uniforme , en particulier dans les nervures . Nous avons observé , par extraction progressive de débris de nervures triés à la pince parmi des feuilles lyophilisées , qu'il existe dans ces tissus une compartimentation analogue à celle observée dans le limbe . Nous avons alors étudié la stabilité relative des formes Aq et Me dans un échantillon donné en fonction du temps de conservation à basse température (- 25°C) et à l'abris de l'humidité . Pour cela , nous avons choisi quatre échantillons que nous avons analysé immédiatement après lyophilisation , puis , après 17 à 21 jours de conservation .

Nous avons présenté dans le tableau 9 les résultats concernant l'un d'entre eux . Le protocole d'extraction utilisé étant celui résumé sur la figure 25 , nous avons obtenu des extraits P (éther de pétrole - méthanol) Me (méthanol et Aq (eau) qualitativement identiques à ceux présentés sur cette figure ; nous avons donc exprimé les résultats en densité optique au maximum d'absorption de ces extraits (tableau 9) . Dans les quatre cas , nous avons obtenu des résultats comparables ; il paraît justifié de

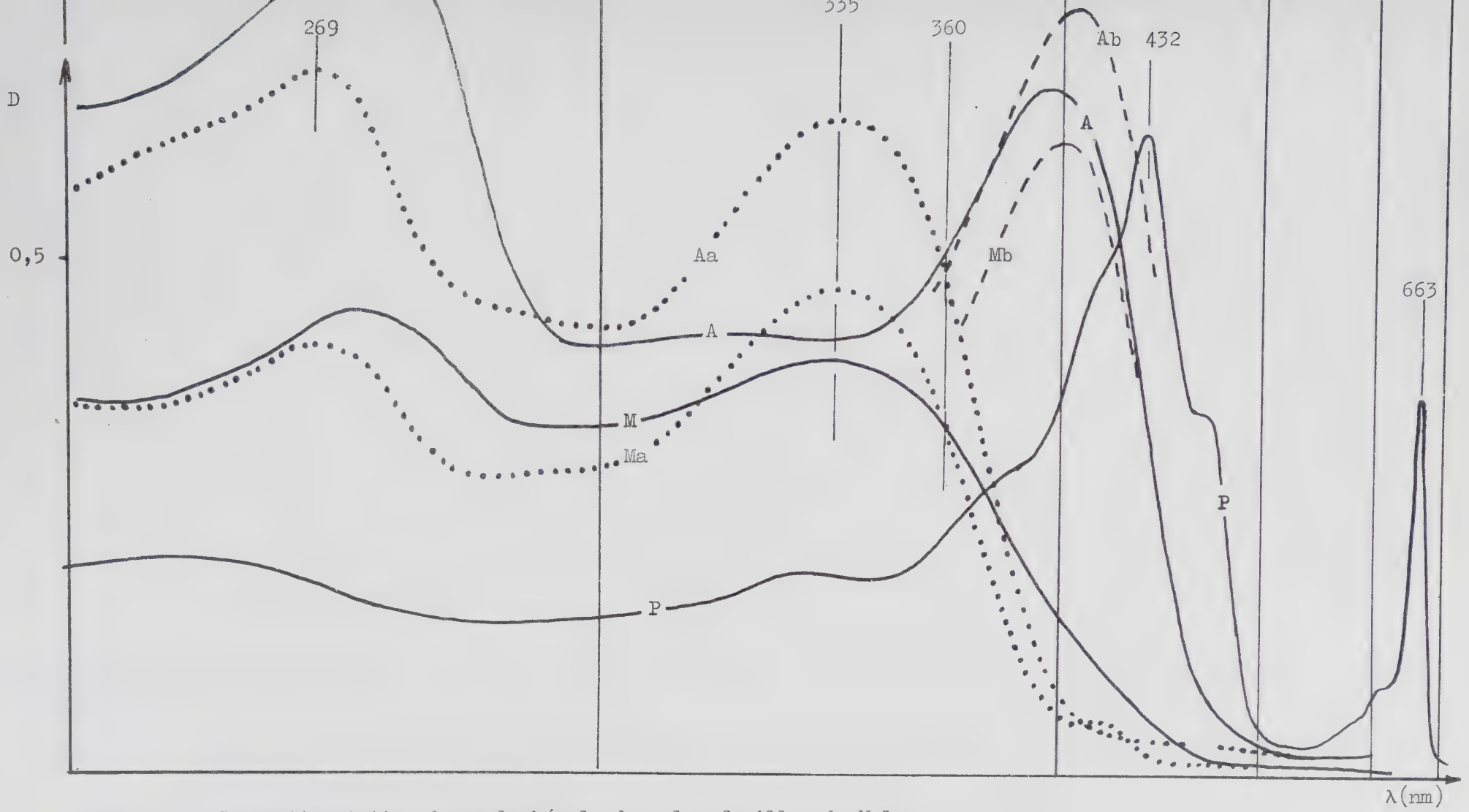


Figure 25 - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles de Melon .

Extraction progressive sur colonne de 50 mg de feuilles sèches successivement par 100 ml de pentane à 2% de méthanol (P), puis 100 ml de méthanol (M) puis 50 ml eau (Aq) . En tiret (b) = déplacement spectral dans la zone 400 nm après alcalinisation (0,1 ml NaOH N pour 2,5 ml d'extrait); en pointillé (a) = spectre après reacidification par 0,1 ml HCl 6N (0,1 ml pour 2,6 ml d'extrait alcalinisé) . Les spectres correspondant aux extraits Aq ont été décalés pour faciliter la lecture .

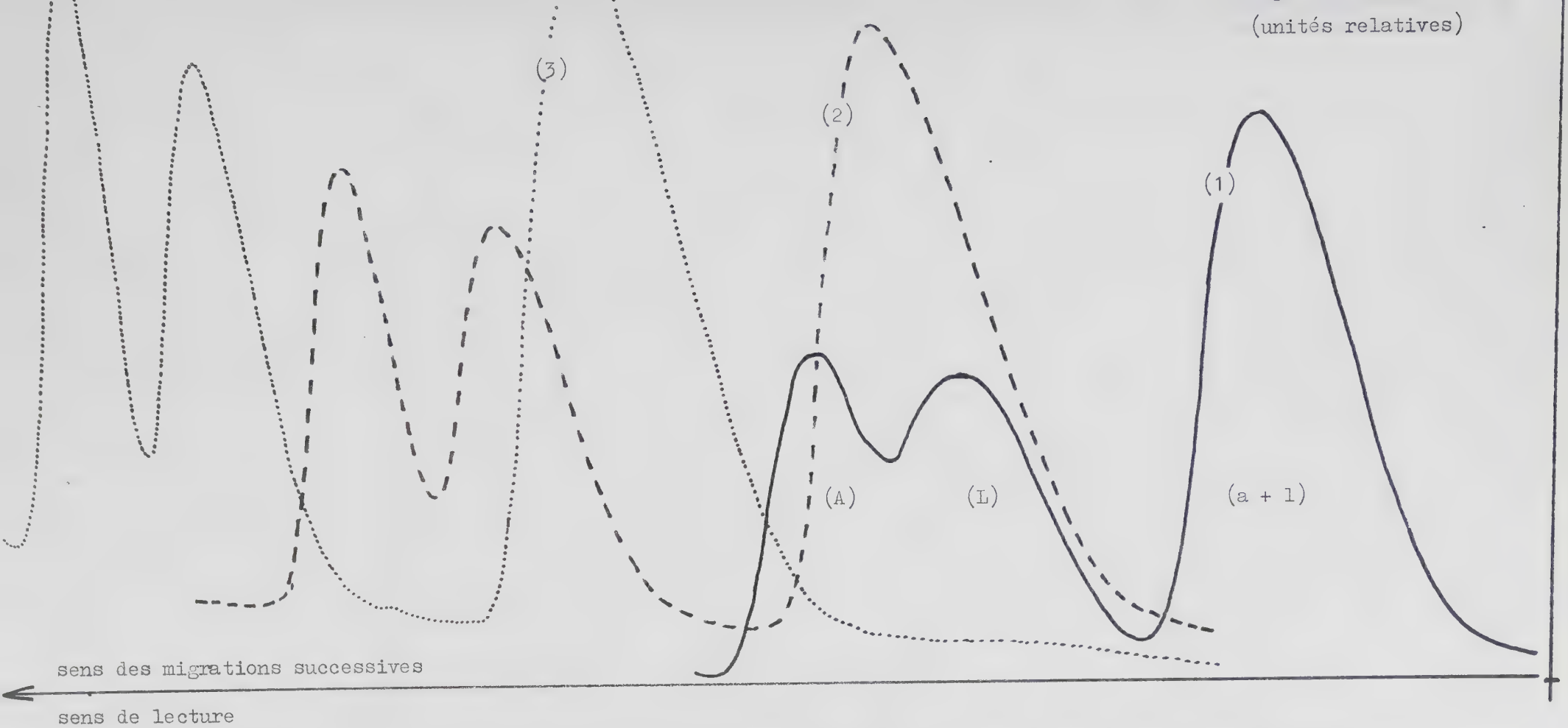


Figure 26 - Influence des migrations successives sur la séparation des mélosides extraits par le méthanol (forme Me) de feuilles de Melon .

Séparation sur couche mince de cellulose MN 300 par l'acide acétique à 1% après 1 , 2 et 3 migrations (respectivement courbe en continu (1) , en tiret (2) , en pointillé (3) . Les 3 pics correspondent , dans le sens de migration au mélange (méloside a , méloside l) , au méloside L et au méloside A ; charge correspondant à 0,3 mg de feuilles .

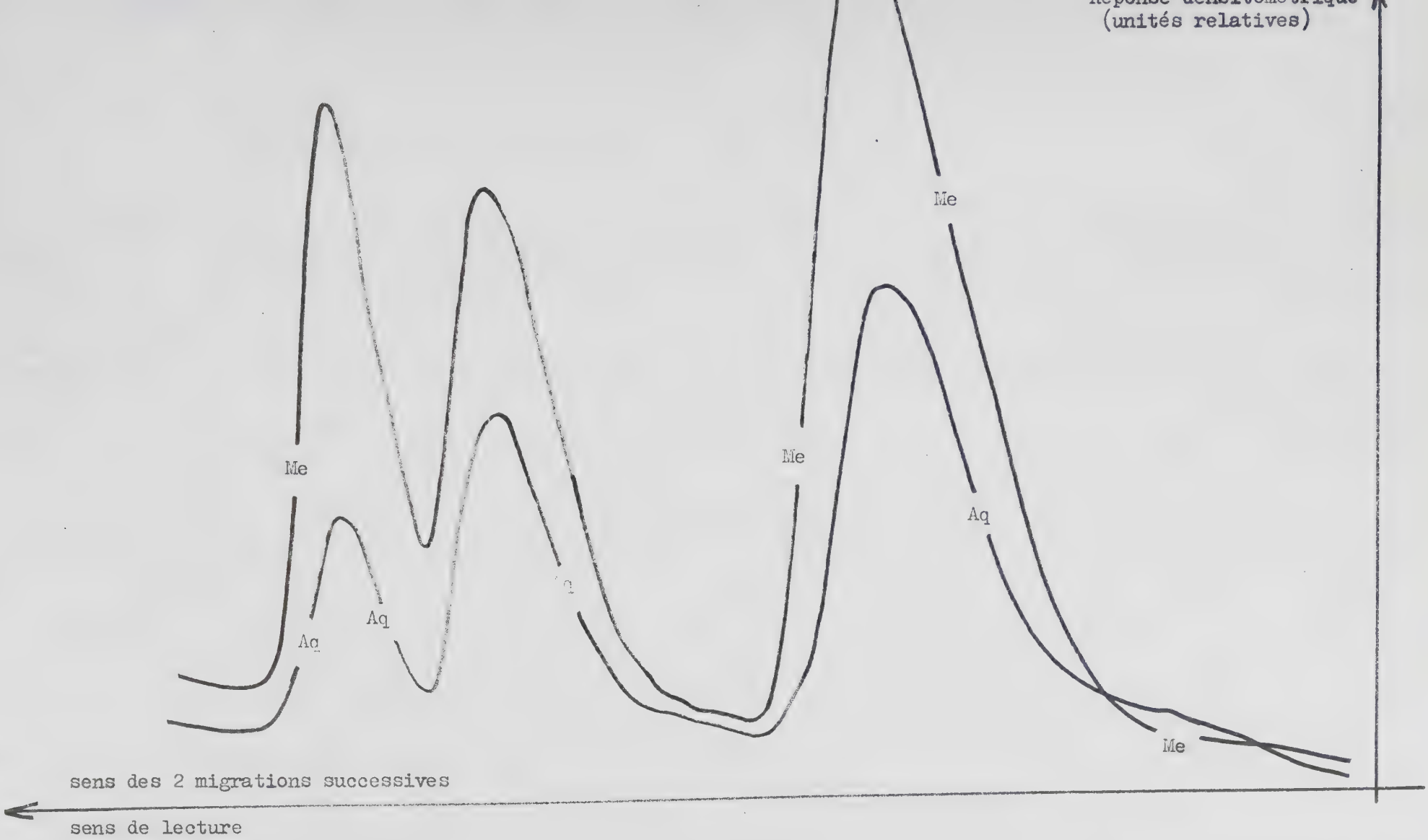


Figure 27 - Dosage réflectométrique des mélosides des extraits méthanoliques , forme Me (Me) , et aqueux Aq (Aq) des feuilles de Melon .

Séparation par 2 chromatographies successives sur cellulose MN 300 par l'acide acétique à 1% , puis dosage par réflectométrie sur couche mince dans l'ultraviolet (figure 5) . Extraits concentrés , repris dans le méthanol (50 µl pour 1 mg de matière sèche) ; charge/tache (1 cm) : M = 15 µl ; A = 45 µl .

Tableau 9 - Reproductibilité des expériences d'extraction progressive sur colonne : stabilité relative des formes Me et Aq en fonction du temps de conservation (J en jours) à - 25°C :

Echantillon : 100 mg de feuille lyophilisée , Culture : Melon repiqués 1 semaine après semis sur vermiculite et cultivé ensuite pendant 1 mois sous lumière blanche (15h/j - 15 000 Lux) - température 20-25°C , Mesure : Densité optique D aux différentes longueurs d'onde (λ nm) des extraits successifs Ether de pétrole à 2% de méthanol (P) , méthanol (Me) , eau (Aq) .

D(λ nm) / J (jours)	Extrait P dans 100 ml		Extrait Me dans 200 ml	Extrait Aq dans 100 ml	Extrait Aq acidifié	Extraits Me et Aq réunis dans 200 ml
	665	432	335	400	335	335
0	0,38	0,68	0,51	0,12	0,16	0,59
17	0,36	0,64	0,51	0,18	0,16	0,59
18	0,40	0,77	0,48	0,23	0,23	0,60
19	0,39	0,75	0,46	0,31	0,31	0,62
20	0,45	0,83	0,54	0,21	0,19	0,63
21	0,38	0,74	0,52	0,18	0,18	0,61
moyenne (écart type)	0,39(0,03)	0,74(0,05)	0,50(0,04)	0,20(0,05)	0,21(0,05)	0,61(0,03)

conclure que les formes Me et Aq mises en évidence par extraction progressive de feuilles de Melon lyophilisées sont stables dans ces conditions et que leur dosage peut être alors réalisé par spectrophotométrie avec une précision de 5 à 10% .

Nous avons ensuite cherché à préciser l'effet de la rapidité de l'élution sur l'importance relative des formes Aq et Me . Pour cela , nous avons pratiqué des extractions parallèles d'un même échantillon , à débit constant et par fractions égales , mais de façon continue ou discontinue . L'expérience a été répétée sur des feuilles de Melon . Nous avons rapporté sur la figure 28 les résultats d'expériences homologues faites sur feuilles de Tomate et de Blé . Dans tous les cas , nous avons constaté que l'augmentation , pourtant considérable de la durée de l'extraction (multipliée en moyenne par 7) , n'entraîne qu'une très faible variation de l'importance relative des polyphénols extractibles par le méthanol et par l'eau .

Ces résultats conduisent à supposer que l'existence des deux formes Me et Aq ne résulte pas du choix des débits d'extractions progressives pratiquées . Pour confirmer ce point , nous avons fait varier la durée d'interruption de l'écoulement de 15 minutes à 3 heures , tout en limitant le nombre des fractions ; les résultats de cette expérience sont reportés sur la figure 29 . Nous avons observé que les densités optiques des premiers extraits méthanoliques , obtenus simultanément , ne varient pas alors que celles des seconds augmentent progressivement et tendent vers un plateau après environ 30 minutes . Comme de plus , les densités optiques de l'extrait aqueux varient corrélativement en sens contraire , il nous paraît fondé de conclure que l'existence des formes Aq et Me dans les feuilles de Melon ne dépend pas du débit d'extraction bien que cependant une quantité de mélosides faible , correspondant à 5% de la densité optique totale , et finie , puisque un plateau d'extraction est observé dès 30 minutes d'interruption de l'écoulement , soit encore extractible par le méthanol lorsque l'extraction est discontinue . Un tel résultat pourrait être expliqué soit par une dégradation de la " structure " des compartiments pendant les discontinuités de l'extraction par le méthanol , soit par l'existence de plusieurs formes Me peu différentes entre elles par leur solubilité et pouvant être globalement extraites par le méthanol mais , suffisamment diversifiées pour être solubilisées à des vitesses différentes. Pour tenter de préciser ce point nous avons donc augmenté le nombre des fractions collectées , en maintenant constant le débit de l'extraction continue . Dans un premier temps nous avons récolté des fractions de 4 ml à l'aide d'un collecteur de fractions (figure 30) : nous avons toujours

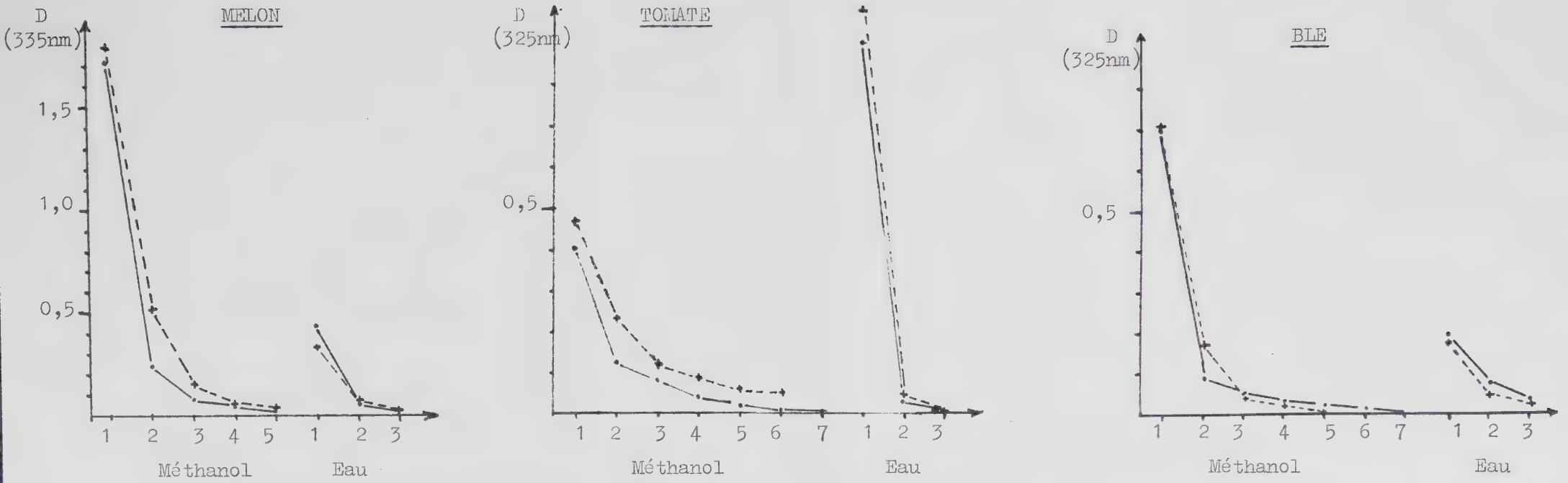


Figure 28 - Influence du mode d'extraction progressive des polyphénols des feuilles de Melon , Tomate et Blé .

Extraction sur colonne de 100 mg de feuilles après élution des pigments liposolubles par 200 ml de pentane à 2% de méthanol . Les extractions ont été faites à débit constant (10 ml/min) ; dans le cas de l'extraction discontinue (courbe en tiret) l'écoulement du solvant a été arrêté pendant 30 minutes entre chaque fraction collectée , l'écoulement n'a pas été arrêté dans le cas de l'extraction continue (courbe continue) . Dans tous les cas on a récolté des fractions de 50 ml dans le méthanol et de 25 ml dans l'eau ; l'ordre d'élution correspond aux numéros portés en abscisse . Les extraits aqueux ont été acidifiés,pour dosage, immédiatement après extraction .

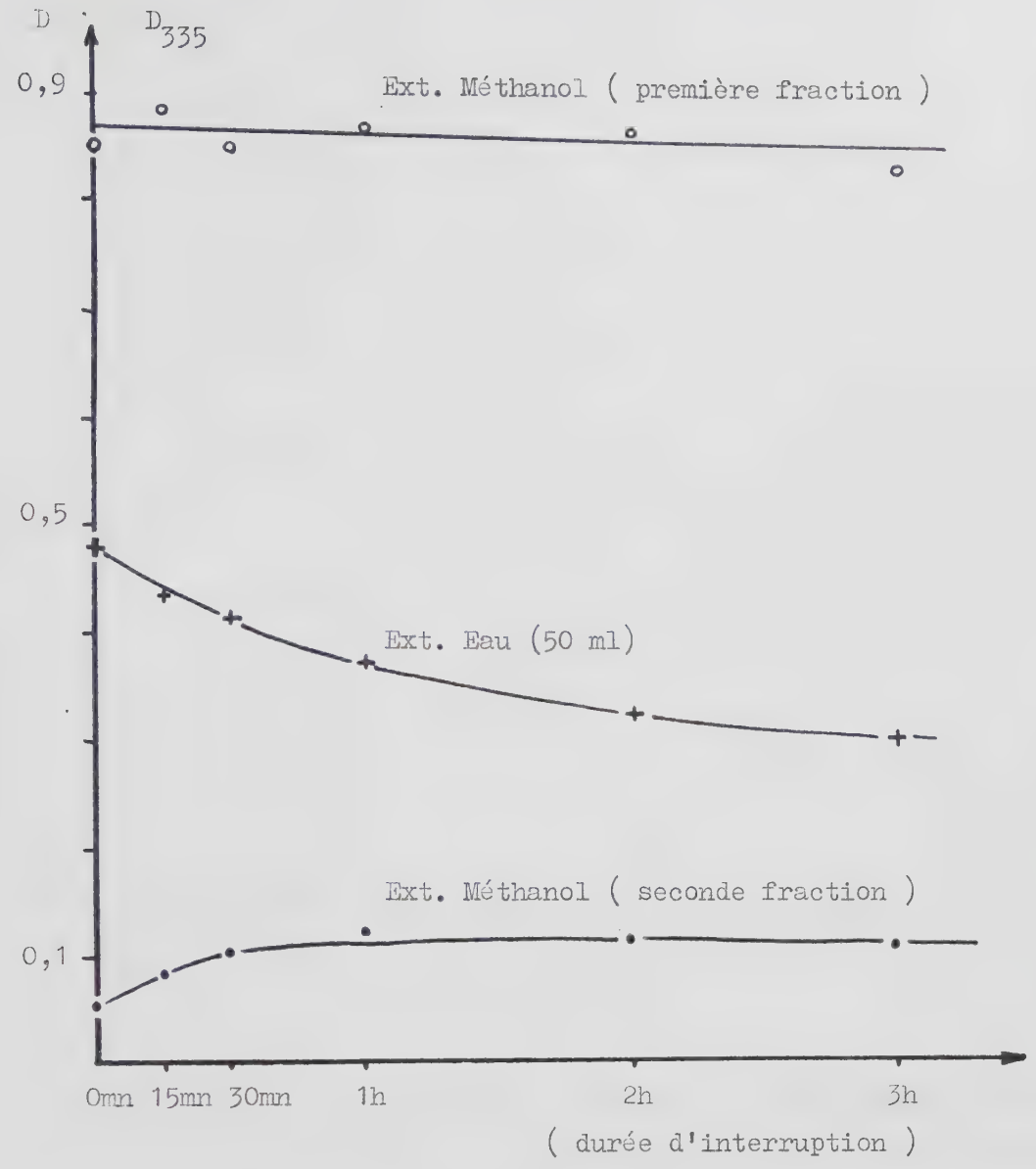


Figure [illegible] - Influence du mode d'extraction progressive sur l'importance relative des formes Me et Aq de feuilles de Melon .

Les formes Me et Aq ont été extraites de 100 mg de feuilles après élution des pigments liposolubles par 200 ml de pentane à 2% méthanol. Les premières fractions méthanoliques (100 ml) ont été obtenues simultanément, puis l'écoulement a été interrompu pendant des durées variables avant élution des secondes (100 ml) . L'extraction par l'eau a été faite ensuite immédiatement . Les densités optiques ont été mesurées à 335 nm , les extraits aqueux étant acidifiés immediatement après extraction .

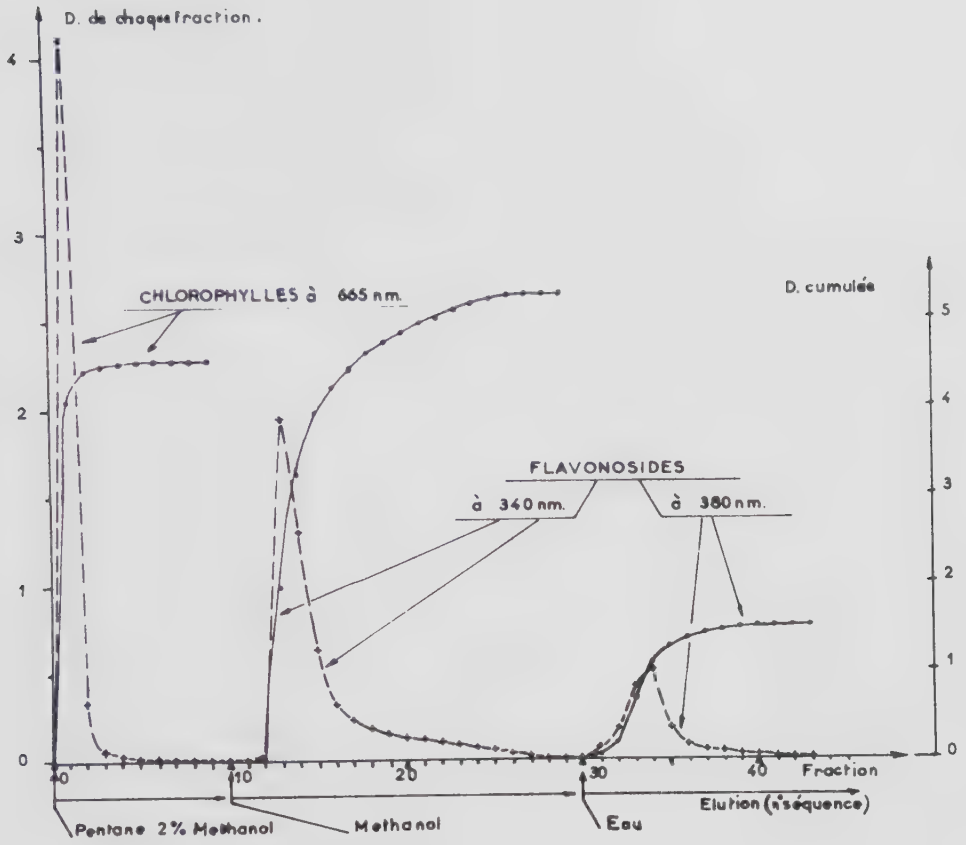


Figure 30 - Courbes d'élution des formes Me (extraites par le méthanol) et des formes Aq (extraites par l'eau) à partir de feuilles de Melon par extraction continue .

20 mg de feuilles sèches ont été éluées selon la séquence présentée en abscisse ; les fractions successives de 4,2 ml ont été obtenues à l'aide d'un collecteur de fractions et les densités optiques mesurées aux longueurs d'onde indiquées . Les densités optiques cumulées (échelle de droite) ont été calculées pour chacun des trois solvants successifs .

observé une décroissance monotone de la densité optique des fractions successives extraites par le méthanol , sans pouvoir mettre en évidence de " pic " correspondant à l'élution d'éventuelles fractions plus fortement liées . Il convient de remarquer , cependant , que la décroissance relative lente de la densité optique des extraits méthanoliques (fractions 15 à 25 : figure 30) par rapport à celle beaucoup plus rapide des pigments liposolubles (fractions 2 à 5 : figure 30) , dont on sait qu'ils sont compartimentés dans les chloroplastes , pourrait être l'indice de l'existence de plusieurs formes de Me .

Pour tenter de préciser ce point , nous avons ensuite pratiqué une extraction continue à l'aide de deux gradients successifs , de méthanol dans l'éther de pétrole , puis d'eau dans le méthanol . Les résultats de deux extractions de ce type sont présentés sur la figure 31 . Malgré l'important " bruit de fond " provoqué par des bulles de solvant , on constate , au moins dans les extraits obtenus à l'aide du second gradient la présence de deux maximums correspondant à deux formes A . Ces expériences ont été répétées , donnant toujours des résultats comparables malgré le " bruit de fond " . Etant données les très faibles quantités de feuilles analysables par cette technique il semble impossible pour le moment de comparer quantitativement ces différentes fractions . Quoiqu'il en soit , tous les résultats obtenus jusqu'ici sont concordants ; ils permettent de conclure que les fractions Me et Aq mises en évidence par extraction progressive ne sont pas des artéfacts et qu'en particulier la variabilité de leurs proportions relatives paraît explicable par l'existence de plusieurs formes Me et Aq solubilisées de façon différente par les deux solvants .

Nous avons alors cherché à préciser l'influence de l'ordre et de la nature des solvants puis de l'état des feuilles sur l'existence des formes Aq et Me .

Dans un premier temps , lors de l'extraction progressive sur colonne de feuilles lyophilisées , nous avons remplacé le premier solvant , éther de pétrole-méthanol par de l'acétone ou de l'éthanol à 95° ou de l'acétone aqueuse à 80% , la suite de la séquence n'étant pas modifiée . Nous avons constaté qu'après extraction par l'acétone à 80%,il ne reste pratiquement plus de mélosides extractibles par le méthanol ou par l'eau . Au contraire après extraction par l'éthanol et l'acétone , il reste un compartiment extractible seulement par l'eau tout à fait semblable quantitativement , par son spectre et son déplacement spectral , au compartiment Aq que l'on peut mettre en évidence par extraction progressive ordinaire (figure 25).

Dans un second temps , les pigments liposolubles étant extraits par l'éther de pétrole-2% méthanol , nous avons comparé les séquences d'extractions suivantes :

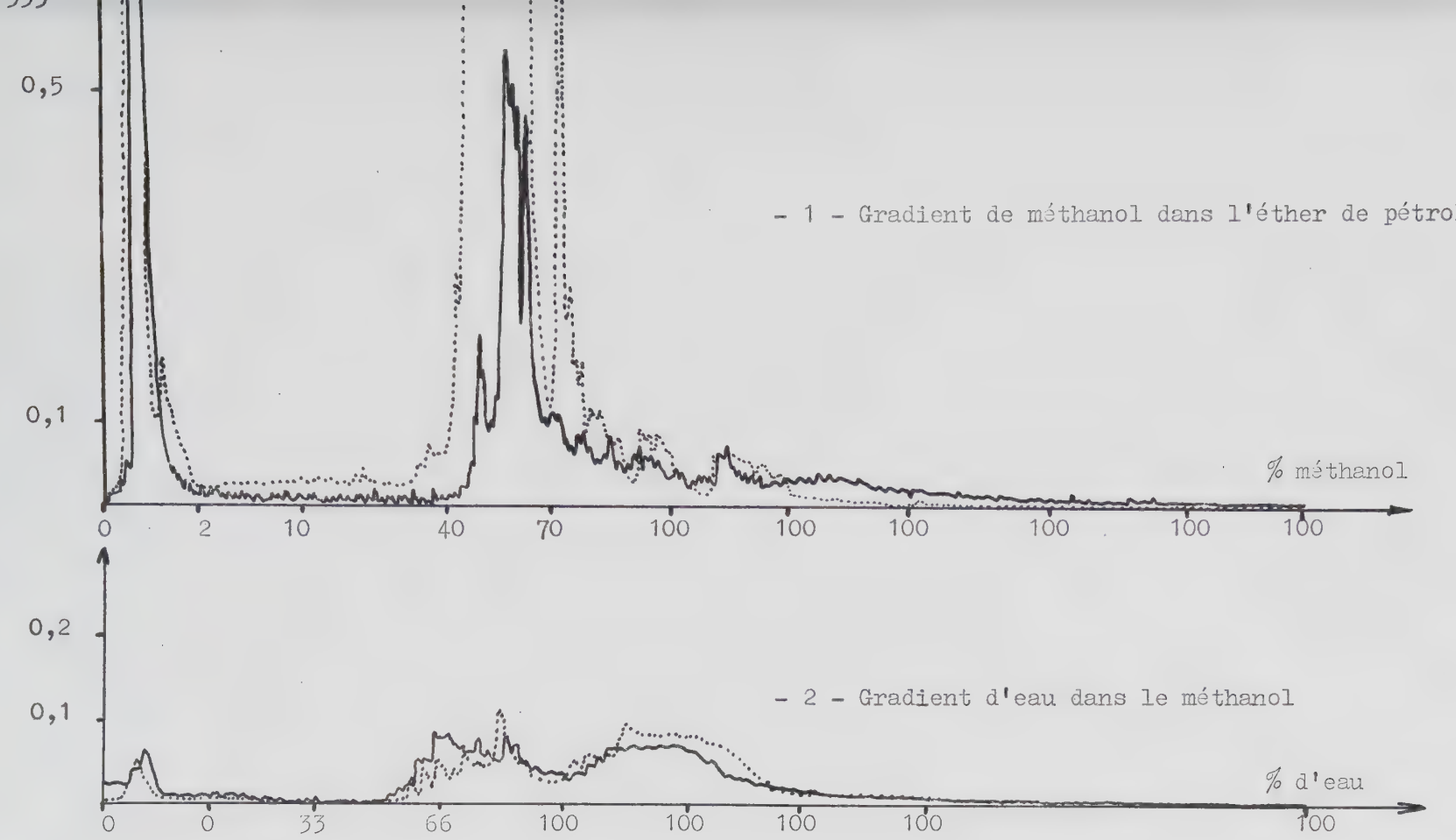


Figure 31 - Mise en évidence de la compartimentation des polyphénols des feuilles de Melon par extraction sur colonne à l'aide de gradients successifs - 1 - de méthanol dans l'éther de pétrole puis - 2 - d'eau dans le méthanol .

L'extraction a été faite , après broyage des feuilles dans du sable, sur des parties aliquotes contenant environ 1mg de feuille sèche , avec un débit constant (160 ml/heure) chaque programme - 1 - et - 2 - étant réalisé en 20 minutes . Densités optiques mesurées en continu à 335 nm .

-(a)- méthanol , puis eau (conditions de la figure 25) ;

-(b)- eau (100 ml) , puis méthanol (100 ml) ;

-(c)- acétone aqueuse à 80% (100 ml) .

Après avoir évaporé l'acétone , nous avons repris l'extrait (c) dans le même volume et comparé , par spectrophotométrie à 335 nm après acidification des extraits , les quantités de mélosides extraites dans ces trois cas . Nous avons constaté que l'eau utilisée comme premier solvant (séquence b) est suffisante pour extraire en totalité les mélosides des feuilles . La quantité ainsi isolée est égale , évidemment , à celle extraite par l'acétone à 80% , et aussi à la somme des quantités extraites par le méthanol (forme Me) et par l'eau (forme Aq) dans la séquence (a) . Compte-tenu du fait que les formes Me et Aq sont composées des mêmes mélosides (figure 26) , ces résultats confirment bien qu'il n'existe qu'une différence qualitative entre les compartiments , l'eau est capable d'extraire en totalité les polyphénols que le méthanol n'extrait que partiellement . Comme cependant toutes les expériences rapportées jusqu'ici ont été faites sur matériel lyophilisé , nous avons tenté de mettre en évidence les formes Me et Aq par extraction sur des feuilles fraîches. Comme précédemment , nous avons tout d'abord cherché à éliminer les pigments liposolubles . Etant donnée la présence dans les tissus frais d'environ 80% d'eau , il s'est avéré impossible d'extraire ces pigments avec le mélange éther de pétrole-méthanol après broyage des feuilles dans un mortier en présence de sable . Etant donnée la plus grande miscibilité à l'eau de l'éther éthylique d'une part , et le fait que nous ayons déja pu employer ce solvant pour mettre en évidence la compartimentation des polyphénols dans les feuilles sèches d'autre part , nous avons choisi ce solvant pour extraire les pigments liposolubles des feuilles fraîches . Dans ces conditions , nous avons extrait les pigments des feuilles , par broyage au mortier en présence de sable , et nous avons comparé les séquences d'extractions suivantes :

-(d)- éther éthylique , puis méthanol et enfin eau ;

-(c)- eau ;

-(f)- méthanol puis eau ;

les volumes de solvant utilisés pour ces extractions étant proportionnellement les mêmes que lors des traitements correspondants de la matière sèche des feuilles .

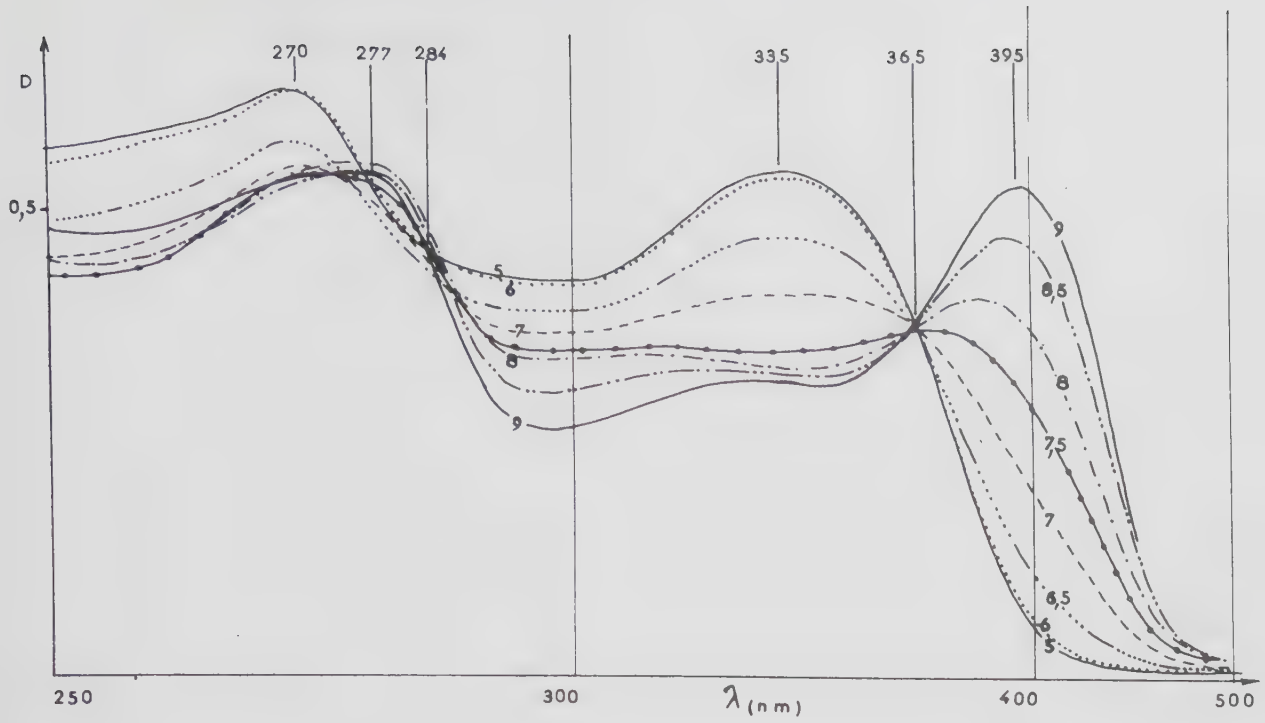
Comme précédemment les dosages des mélosides ont été faits par spectrophotométrie à 335 nm et après acidification des extraits . Là encore , nous avons constaté que l'eau utilisée , comme premier solvant (expérience e) , est suffisante pour extraire en totalité les mélosides des feuilles . La quantité ainsi isolée est égale à la somme des quantités extraites par le

méthanol , puis par l'eau selon la séquence (d) . En conclusion , les formes Me et Aq peuvent être mises en évidence de la même façon dans les feuilles fraîches et dans les feuilles lyophilisées .

Cependant , utilisant le méthanol comme premier solvant d'extraction de feuilles fraîches , selon la séquence (f) , nous avons constaté invariablement une diminution (et parfois une disparition totale) des mélosides extractibles ensuite par l'eau . Pour tenter d'expliquer ce dernier résultat , nous avons donc traité selon cette même séquence (f) des feuilles lyophilisées lors de l'extraction progressive sur colonne standard (figure 2) . Dans tous les cas , nous avons observé que , le méthanol permet l'extraction , en mélange , des pigments liposolubles et de la forme Me laissant la forme Aq , extractible ensuite par l'eau , inchangée . Il est donc justifié de conclure que lors de l'extraction de feuilles fraîches , la présence de l'eau tissulaire dans le méthanol est suffisante pour permettre l'extraction partielle , et parfois totale , de la forme Aq par le méthanol . De ce fait , on peut assimiler les propriétés de solvant du méthanol-aqueux à celles de l'acétone à 80% , tous deux susceptibles d'extraire la totalité des pigments des feuilles fraîches ou lyophilisées .

Ce second ensemble de résultats conduit à conclure que les polyphénols forment dans les feuilles de Melon deux compartiments que l'on peut séparer par extraction progressive à l'aide de méthanol (forme Me) puis d'eau (forme Aq) . Ces deux compartiments , formes Me et Aq , peuvent être mis en évidence à partir de feuilles fraîches aussi bien que de feuilles lyophilisées ; ils ne sont pas des artéfacts de lyophilisation .

En conséquence , nous avons cherché à expliquer l'origine de ces deux compartiments . Compte-tenu de la forme des spectres des extraits méthanoliques (forme Me) et aqueux (forme Aq) des feuilles de Melon (figure 25) , nous avons tout d'abord supposé que l'ionisation des mélosides était suffisante pour expliquer la différence de solubilisation des deux formes . En effet , dans le domaine des pH compris entre 6 et 8 , susceptibles d'exister à l'intérieur des cellules , nous avons constaté une variation considérable de la migration électrophorétique , donc de l'état électrostatique , des mélosides (figure 16 A) . Nous avons , de plus , observé que la forme du spectre d'absorption des mélosides varie , dans cette même zone de pH , de façon tout aussi considérable (figure 32) . Compte-tenu de ces différences , nous avons essayé de modifier le pH des feuilles afin de préciser son influence sur l'importance relative des formes Me et Aq . Pour cela , nous avons préparé trois aliquotes d'un même broyat de feuilles que nous avons finement dispersé , à l'aide d'un broyeur , avec respectivement des masses égales de KH_2PO_4 ou de $Na_2H\ PO_4$,



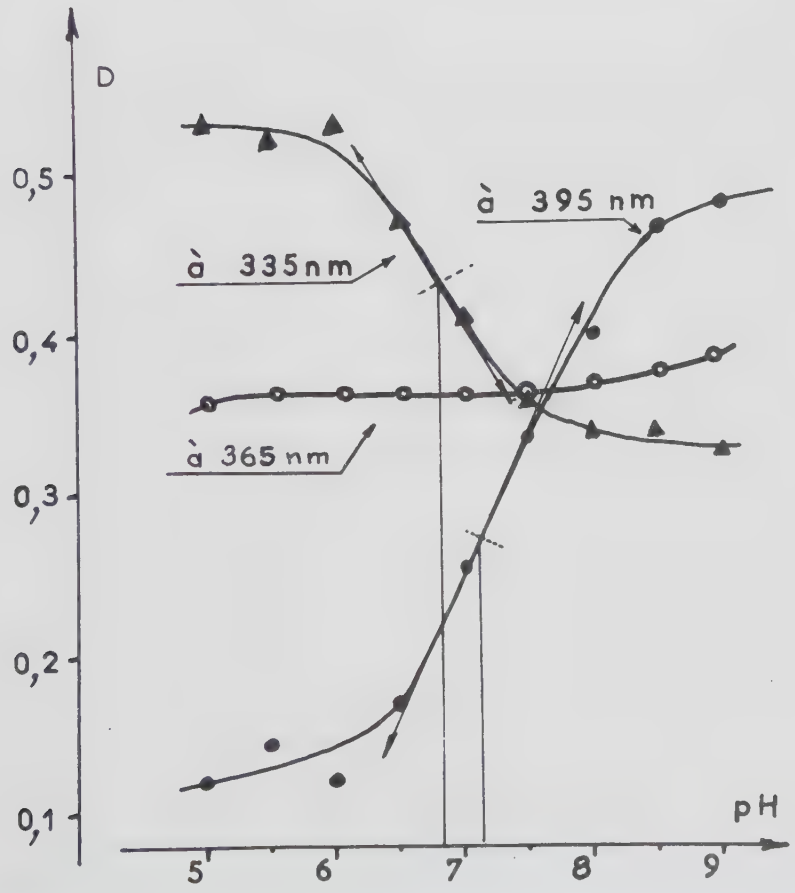


Figure 32 - Influence de l'ionisation des mélosides sur leur spectre d'absorption .

En haut : extrait méthanolique (forme Me) repris dans l'eau et dilué v/v dans du tampon phosphate 0,1 M ; les pH sont indiqués sur les courbes . En bas : variation des densités optiques en fonction du pH aux maximums d'absorption 335 nm et 395 nm et au point d'égale densité (365 nm) .

la troisième aliquote servant de témoin ne recevant aucun additif . Nous avons ensuite fait subir à ces trois échantillons une extraction progressive sur colonne et nous avons comparé , par spectroscopie , les formes Me et Aq ainsi isolées . Dans tous les cas , nous avons constaté l'existence de deux compartiments extractibles respectivement par le méthanol (forme Me) puis par l'eau (forme Aq) . Nous avons cependant constaté que les spectres d'absorption des formes Me et Aq était modifiée . Dans l'expérience témoin nous avons observé , comme précédemment (figure 25) que les maximums de la forme Aq , vers 275 et 400 nm , étaient déplacés par rapport à ceux de la forme Me à 269 et 335 nm . En présence de KH_2PO_4 , le spectre de la forme Aq n'était pas déplacé par rapport à celui de la forme Me (maximums vers 275 et 400 nm) . Nous avons vérifié , par comparaison des densités optiques des extraits éventuellement acidifiés , que les quantités relatives des formes Aq et Me n'étaient pas modifiées dans ces trois expériences . Le broyage des feuilles dans les mêmes conditions mais avec Na_2CO_3 provoque les mêmes variations qualitatives et quantitatives qu'avec $Na_2H\ PO_4$. Enfin , la forme des courbes d'élution des formes Me et Aq (figure 30) n'est pas modifiée de façon significative par apport de KH_2PO_4 . L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer que l'ionisation des flavonoïdes , qui suffit pour rendre compte de la différence entre les spectres des formes Me et Aq , ne permet pas d'expliquer leur différence d'extractibilité et donc l'existence de deux compartiments . Un dernier résultat confirme cette conclusion : nous avons constaté que systématiquement le pH des extraits aqueux de feuilles (forme Aq) est alcalin et compris entre 7,5 et 9,5 alors que celui des extraits méthanoliques évaporés et repris , volume à volume , dans de l'eau est légèrement acide (pH compris entre 5,5 et 6,5) . Les différences entre les spectres des formes Me et Aq seraient donc révélatrices seulement du pH de ces extraits .

Ces premiers résultats étant acquis , nous avons supposé que la formation de complexes avec des composés hydrophiles (sels chélatables , protéines) susceptibles , par ailleurs , de modifier le spectre d'absorption des mélosides , pourrait expliquer l'existence de cette compartimentation . Pour vérifier cette hypothèse nous avons utilisé la même méthode que précédemment . Nous avons finement broyé des parties aliquotes de feuilles en présence de ces composés , puis nous avons extrait sur colonne les fractions Me et Aq que nous avons comparées ensuite qualitativement (position des maximums) et quantitativement (densités optiques) .

Dans un premier temps nous avons étudié l'influence de deux sels : l'aluminate et le borate de sodium , respectivement Al_2O_3 , 2 Na_2O et $Na_2B_4O_7$. Nous avons donc broyé des aliquotes de poudre sèche avec chacun de ces sels , en présence d'un mélange équipondéral de KH_2PO_4 et de Na_2HPO_4 ; au total , 10 mg de sel et 50 mg de phosphate pour 100 mg de feuilles . Après extraction sur colonne , nous avons constaté encore l'existence de deux formes extraites par le méthanol puis l'eau . En particulier , nous avons vérifié que leur teneur n'est pas modifiée de façon significative et que leur spectre , dans tous les cas , est simplement déplacé vers les grandes longueurs d'onde . De ces faits , il paraît justifié de conclure que l'existence des formes Me et Aq ne dépend pas de la présence de sels chélatables .

Dans un second temps , nous avons étudié l'influence de la présence de protéine sur l'existence des formes Me et Aq . Pour cela , nous avons broyé des parties égales de feuilles et de serumalbumine bovine . Nous avons réalisé la même expérience dans des conditions identiques , avec de la polyvinylpyrolidone (MERCK) de poids moléculaire 35 000 . Dans les deux cas nous avons observé , comme précédemment , que la présence de protéines , ou d'analogues , n'a pas d'effet sur l'existence des deux formes Aq et Me extractibles des feuilles de Melon .

En conséquence , l'ensemble de ces trois séries d'expériences nous a conduit à conclure que l'addition , aux poudres de feuilles , de composés susceptibles de modifier le pH des extraits ou de former des complexes avec les polyphénols ne modifie pas l'importance relative des deux compartiments , formes Me et Aq , extractibles de ces feuilles . Nous avons donc supposé qu'il devait en être de même , pour les composés présents normalement dans les feuilles et susceptibles d'exercer ces mêmes types d'effets .

En conséquence , il nous a paru raisonnable de rechercher l'origine de la compartimentation des polyphénols dans des associations moléculaires avec des composés insolubles des feuilles .

Pour vérifier cette hypothèse , nous avons tenté de reformer les fractions Me et Aq en " reconstituant " une poudre de feuilles par mélange puis lyophilisation d'un extrait méthanolique , fraction Me , avec les composés insolubles de feuilles restant dans la colonne après l'extraction progressive habituelle . Dans un premier temps , nous avons donc préparé , par extraction progressive , le résidu insoluble de feuilles . Pour cela , des feuilles lyophilisées ont été traitées sur colonne sans avoir été dispersées dans du sable . L'extrait méthanolique , forme Me , ainsi obtenu a été évaporé et repris dans l'eau . L'eau résiduelle , imbibant le résidu insoluble de feuilles resté sur la colonne , a été éliminée par entraînement à l'éther . Le rendement en composés insolubles est d'environ 50% .

La reconstitution des poudres de feuilles a été faite en lyophilisant des parties aliquotes de forme Me reprise dans l'eau et des composés insolubles . Dans tous les cas , les aliquotes de forme Me ont été ajustées au même volume , en général 1 ml . Les poudres ainsi reconstituées ont été traitées sur colonne et les mélosides dosés par différence (figure 3) .

Sur l'ensemble des expériences , nous avons observé , en moyenne , des rendements d'incorporation dans la poudre de l'ordre de 50% et des rendements totaux de récupération de l'ordre de 80% . Dans un premier temps , nous avons constaté que l'extraction progressive des poudres reconstituées à partir de la forme Me permet de mettre en évidence les deux formes Me et Aq (figure 33) dont les propriétés sont identiques à celles extraites des feuilles (figure 25) .

Réciproquement , nous avons constaté que si la poudre est reconstituée à partir d'extraits aqueux de feuilles , forme Aq , l'extraction progressive permet encore de mettre en évidence les deux formes Me et Aq . Enfin le même résultat a été obtenu après reconstitution de la poudre à l'aid d'extrait méthanolique , forme Me , non repris dans l'eau . Ce dernier groupe de résultats , joint aux précédents , permet donc de conclure que le phénomène de compartimentation des mélosides dans les feuilles de Melon résulte de l'interaction des polyphénols avec les composés insolubles des feuilles . Pour préciser ce point , nous avons reconstitué la poudre en ajoutant des quantités croissantes de méloside à des aliquotes égales de composés insolubles . Nous avons constaté , dans tous les cas , que l'importance relative de la forme Me varie de façon sensiblement proportionnelle à la quantité de méloside ajoutée et qu'il n'en est pas de même pour la forme Aq (figure 33) . Ces observations confirment donc les conclusions précédentes ; elles permettent de supposer l'existence , dans les structures insolubles des feuilles , de sites récepteurs capables de fixer au moins les mélosides constituant la forme Aq . La très faible corrélation existant entre l'importance de la forme Aq extraite de poudre reconstituée et la quantité de méloside ajoutée serait alors l'indice d'un nombre fini de sites associés à ces structures insolubles .

Cependant , comme les feuilles entières constituent un matériel beaucoup trop hétérogène pour que l'analyse de la compartimentation mérite pour le moment , d'y être étudiée davantage , nous avons recherché ce même phénomène dans les chloroplastes (MONTIES , 1971) .

III - B - 2 - 2 - Compartimentation dans les préparations chloroplastiques de Melon .

Nous avons à nouveau utilisé la méthode d'extraction progressive à l'aide de solvants pour mettre en évidence la compartimentation des polyphénols présents dans les préparations chloroplastiques lyophilisées .

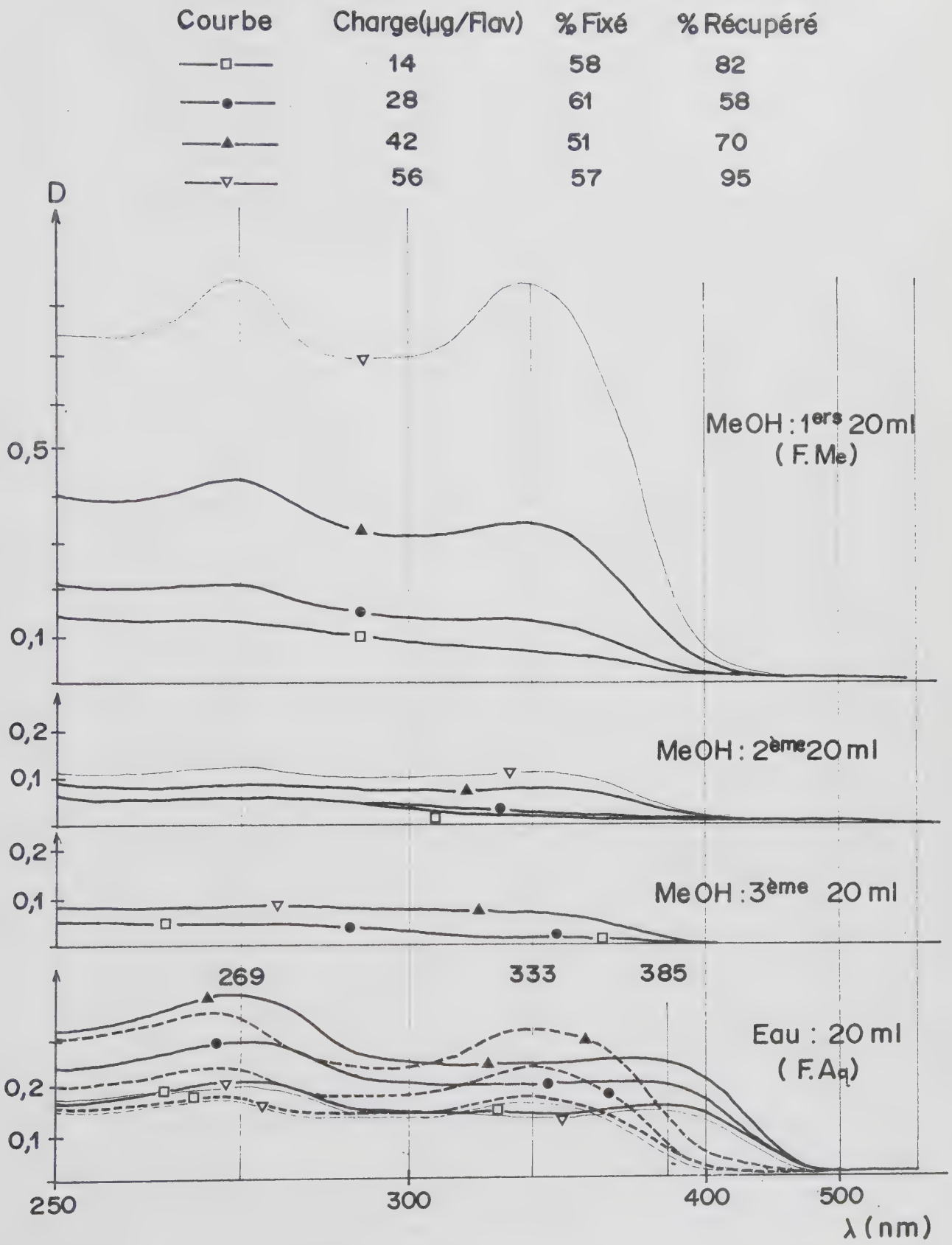


Figure 33 - Spectre d'absorption des extraits de poudre de feuilles de Melon reconstituée par lyophilisation d'extrait méthanolique (F. e) en présence de 15 mg de résidu insoluble de feuilles .

Nous avons employé la séquence d'extraction progressive : éther de pétrole à 2% de méthanol puis méthanol et enfin eau .

Dans ces mêmes conditions , nous avons rapporté , précédemment , la présence dans les extraits aqueux de chloroplastes traités par le méthanol, des substances jaunes (MONTIES , 1969) ultérieurement identifiées à des mélosides dans le cas des chloroplastes de Melon (MONTIES , 1971) . Pour pouvoir analyser les polyphénols présents dans les deux compartiments extraits par le méthanol (forme Me) et l'eau (forme Aq) nous avons donc traité des quantités importantes , de l'ordre de 500 mg , de préparations chloroplastiques lyophilisées . Les résultats d'une telle extraction sont présentés sur les figures 34 et 35 . La figure 34 permet de comparer les extraits méthanoliques de feuilles et de préparations de chloroplastes . Les propriétés spectrales de la forme Me de feuilles sont tout à fait comparables à celles rapportées sur la figure 25 . Au contraire , le spectre de l'extrait méthanolique brut (Ct) de chloroplastes est très différent de celui de feuilles (F) . Ce n'est qu'après lavage par l'éther (courbe C) puis alcalinisation (courbe Cb) et acidification (courbe Ca) qu'il devient possible de caractériser les mélosides dans cet extrait . Après lavage , la forme du spectre de l'extrait méthanolique concentré de chloroplastes de Melon est donc tout à fait semblable à celle des extraits des chloroplastes d'autres Angiospermes (figure 23) . Les données de la figure 35 permettent de comparer les extraits aqueux des feuilles et des préparations de chloroplastes correspondantes . Les spectres et les déplacements spectraux des extraits aqueux de chloroplastes sont semblables à ceux des feuilles et comparables à ceux des mélanges de mélosides (figure 32) . Ce premier ensemble de résultat permet de conclure que <u>les polyphénols forment , dans les préparations chloroplastiques comme dans les feuilles , deux compartiments extractibles successivement par le méthanol (forme Me) puis par l'eau (forme Aq)</u> .

Nous avons ensuite comparé la composition de ces compartiments par densitométrie sur couche mince après séparation chromatographique des mélosides . Nous avons constaté (figure 36) qu'il existe dans chacun des extraits les trois pics correspondants aux mélosides A , L et au mélange a , l . Les proportions relatives des mélosides dans les formes Aq et Me homologues sont cependant différentes comme nous l'avions déja remarqué (figure 27) . Les résultats des dosages densitométriques correspondants sont présentés dans le tableau 10 : on constate que , par rapport aux feuilles , il existe , dans les préparations chloroplastiques , relativement

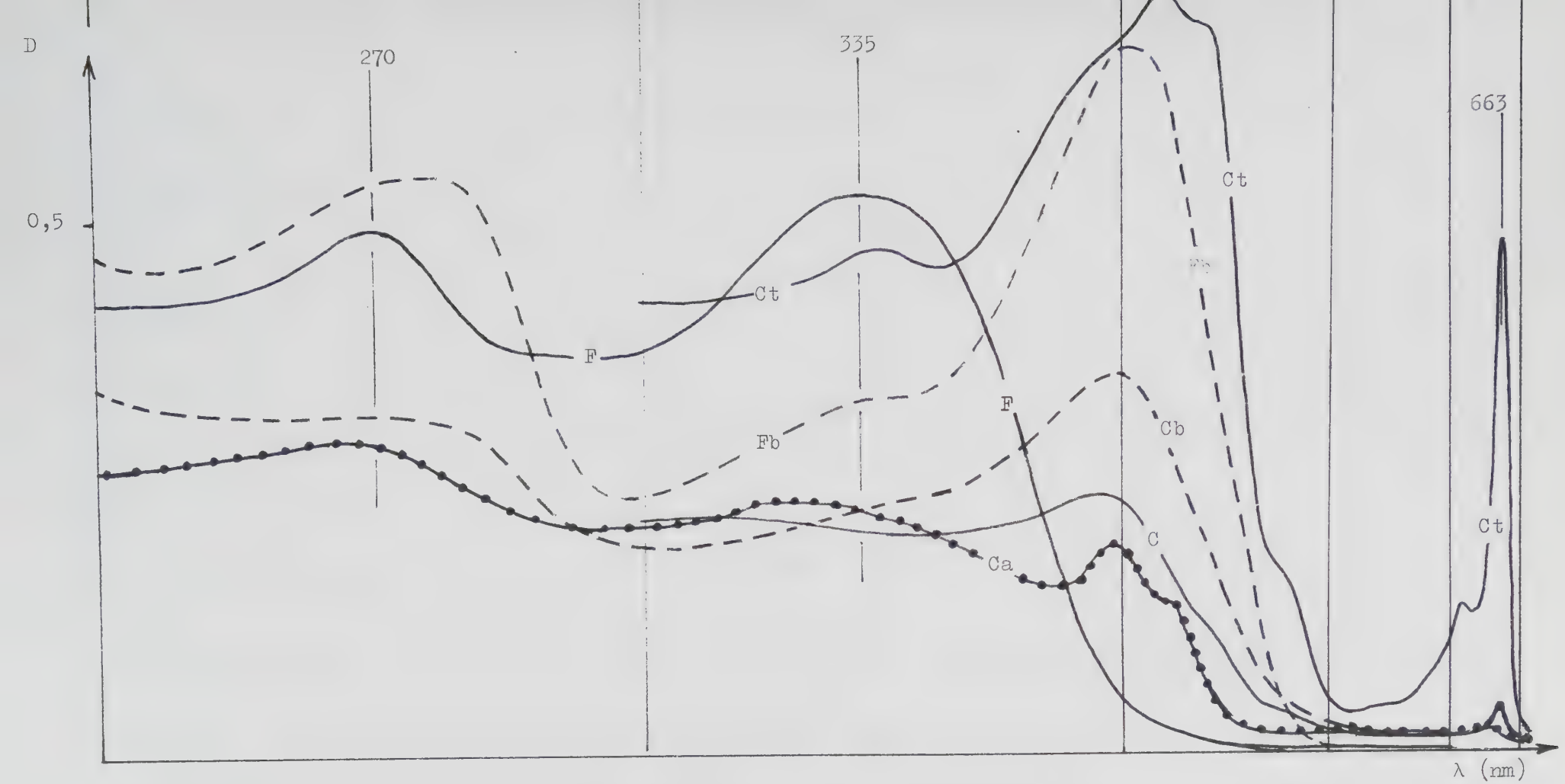


Figure 34 - Spectres d'absorption comparés des extraits méthanoliques (forme Me) de feuilles de Melon et de leurs préparations chloroplastiques (formes Aq correspondantes : figure 35)

Spectres des extraits méthanoliques de feuilles (100 ml pour 100 mg de matière sèche) et de chloroplastes (100 ml pour 300 mg de matière sèche) avant (courbes continues F , Ct , C) et après alcalinisation (courbe en tirets Fb , Cb) . Une aliquote de l'extrait méthanolique brut (Ct) de chloroplastes a été évaporée , lavée par l'éther éthylique et reprise dans le même volume (C) ; les déplacements spectraux induits par alcalinisation (Cb) et acidification (Ca) selon le protocole de la figure 35, sont reversibles .

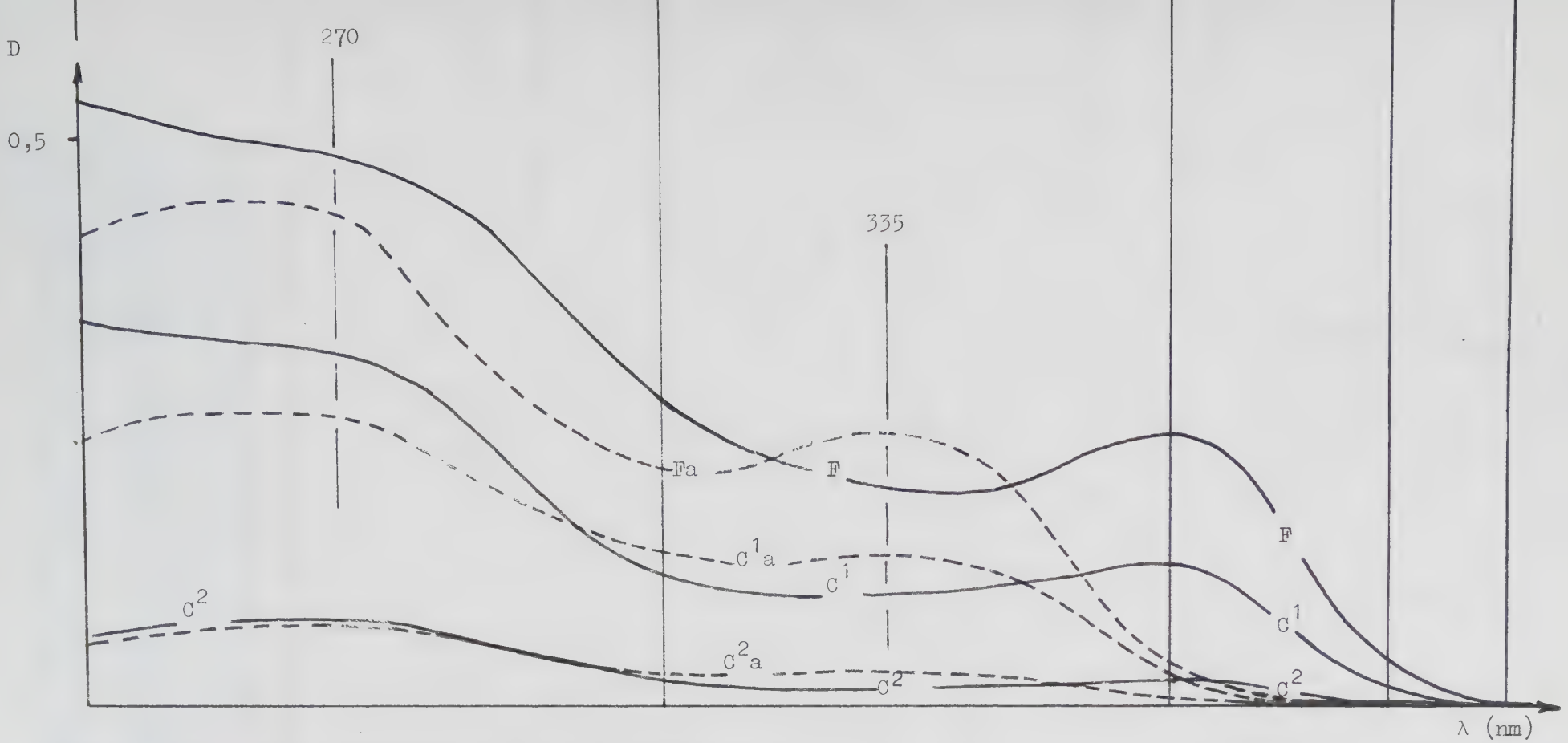


Figure 35 - Spectres d'absorption des extraits aqueux (forme Aq) de feuilles de Melon et de leurs préparations chloroplastiques (formes Me correspondantes : figure 34)

L'extrait aqueux de feuilles (50 ml pour 100 mg de matière sèche) et des deux extraits successifs des chloroplastes (25 ml pour 300 mg de matière sèche) ont été acidifiés immédiatement après extraction (courbes Fa , C^1a , C^2a en pointillé) puis alcalinisés (courbes F , C^1 et C^2 en continu) selon le protocole de la figure 35 . Le déplacement spectral induit par alcalinisation est totalement reversible par reacidification .

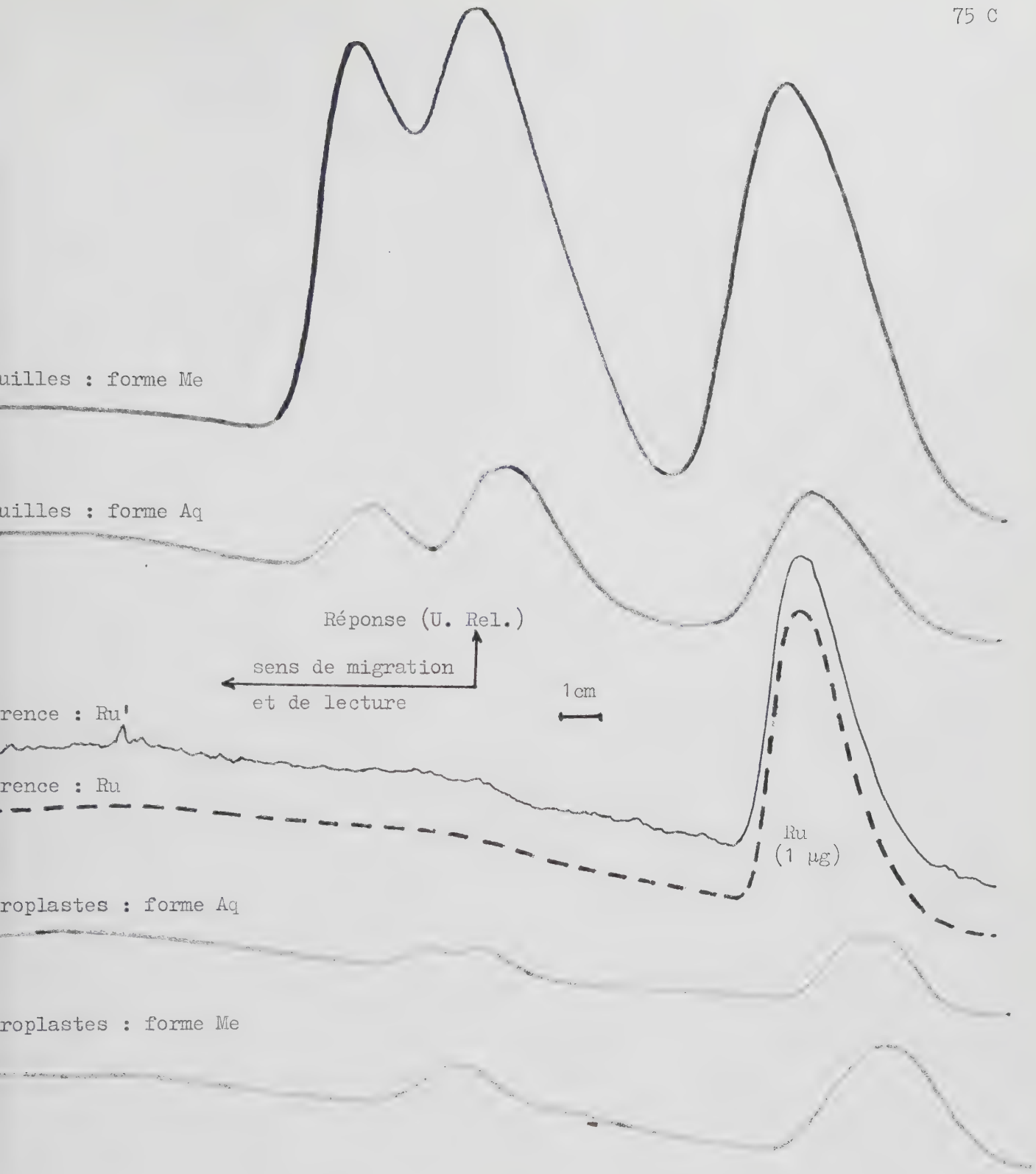


Figure 16 - Comparaison par densitométrie sur couche mince des mélosides des formes Me et Aq de feuilles et chloroplastes de Melon . (Séparation sur cellulose MN 300 , 2 migrations successives dans l'acide acétique à 0,5%) .

Courbes Ru et Ru' : charge de référence - Rutine (Ru) : 1 µg ; lecture densitométrique selon le protocole de la figure 5 (amplification maximum) : courbe en pointillé (Ru) correspondant à la courbe (Ru') figurée avec le bruit de fond de lecture .

Les charges des taches (formes Me et Aq) correspondent pour les feuilles et les préparations chloroplastiques aux extraits de 0,2 et 4,5 mg de matière sèche .

plus de mélosides a et l que des mélosides A et L ; il y a donc " enrichissement relatif " des chloroplastes en mélosides acylés . Il convient de souligner que les mesures densitométriques ont été faites par référence à la rutine ; nous avons donc exprimé les teneurs en mélosides en équivalents de rutine . Ce mode d'expression des résultats entraîne évidemment une erreur systématique , dans le cas des mélosides a et l , parceque ces mélosides contiennent de l'acide caféique dont la réponse réflectométrique s'ajoute à celle du noyau flavone commun aux quatre mélosides . Nous avons cependant utilisé cette méthode parcequ'elle permet malgré tout des mesures relatives . Les résultats des mesures densitométriques sont du même ordre de grandeur que les estimations spectroscopiques (tableau 10) . Aussi , les estimations spectroscopiques faites par différence à 400 nm entre , l'absorption des extraits méthanoliques ou aqueux après alcalinisation et reacidification , comme par exemple sur les figures 25 , 34 et 35 , peuvent donc être utilisées au moins de façon semi-quantitative.

Ces résultats étant obtenus , nous avons cherché à préciser l'origine du phénomène de compartimentation dans les préparations chloroplastiques . Nous avons supposé que , comme dans les feuilles , la compartimentation des polyphénols pouvait résulter d'interactions avec les structures insolubles des chloroplastes . Pour vérifier cette hypothèse , nous avons traité sur colonne de façon préparative environ 500 mg de chloroplastes , sans toutefois les disperser dans du sable . Nous avons récupéré ensuite la partie insoluble . Nous avons enfin " reconstitué " la préparation chloroplastique par lyophilisation de cette partie insoluble avec des mélosides , forme Me , repris dans de l'eau . Les expériences ont été faites d'une part sur des chloroplastes isolés en présence de saccharose mais aussi sur des chloroplastes lavés par de l'eau . Comme lors de l'expérience de reconstitution faite sur feuilles (figure 33) nous avons ajouté à des parties aliqotes égales de résidu insoluble de chloroplastes des quantités croissantes de mélosides . Après extraction sur colonne des poudres reconstituées , nous avons constaté à nouveau , et dans tous les essais , l'existence de deux compartiments extractibles respectivement par le méthanol puis par l'eau .

De l'ensemble de ces résultats , il parait justifié de conclure que le phénomène de compartimentation , que nous avons mis en évidence dans les préparations chloroplastiques lyophilisées , résulte d'une interaction des mélosides avec les structures insolubles des chloroplastes . Ainsi , après avoir décrit la compartimentation des polyphénols dans les feuilles et les chloroplastes de Melon , nous avons recherché l'existence de ces mêmes phénomènes chez d'autres Angiospermes .

Tableau 10 - Importance relative des différents mélosides dans les formes Me et Aq extraites de feuilles de Melon et de leurs préparations chloroplastiques .

Les mélosides ont été dosés par densitométrie sur couche mince, selon le protocole de la figure 4 et les enregistrements de la figure 36 ; l'estimation spectrophotométrique a été faite par différence à 400 nm , comme sur les figures 34 et 35, selon le protocole de la figure 3 . Les résultats sont exprimés en µg équivalents à la rutine choisie pour référence (Ru) .

Mélosides (µg Ru/100 mg MS)	Feuilles		Chloroplastes	
	forme Me	- forme Aq	forme Me	forme Aq
A + L	4650	200	26,5	1,2
a + l	4800	160	56,2	1,8
Total	9450	360	83	3,0
Estimation spectroscopique	6800	550	55	22

III - B - 2 - 3 - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles et les préparations de chloroplastes de Tomate .

Les feuilles de Tomate lyophilisées ont été traitées sur colonne selon le protocole de la figure 25 . Les spectres des extraits sont présentés sur la figure 37 . Le spectre de l'extrait méthanolique (forme Me) possède la forme caractéristique de celui des flavonoïdes et de la rutine en particulier , alors que le spectre de l'extrait aqueux (forme Aq) possède la forme caractéristique de celui des acides cinnamiques et en particulier de l'acide chlorogénique . Nous avons donc recherché , après séparation sur couche mince , la présence de ces deux polyphénols déja décrits dans les feuilles de Tomate . Dans un premier temps (figure 38), nous avons identifié , par cochromatographie et d'après leurs réactions colorées , la rutine et l'acide chlorogénique dans les extraits Me et Aq de feuilles . Nous avons vérifié , par électrophorèse haute tension sur couche mince , tant à pH 9,0 dans des tampons phosphate ou borate (figure 16) et à pH 2,0 dans du tampon acide tartrique-tartrate neutre de sodium (0,1 M) , que l'acide chlorogénique identifié dans les formes Me et Aq migre comme l'acide chlorogénique de référence . Ces résultats permettent de conclure que , dans les feuilles de Tomate , la rutine et l'acide chlorogénique existent dans les formes Me et Aq et donc que la compartimentation des polyphénols ne concerne pas seulement les flavonoïdes . De plus , nous avons constaté que l'intensité des taches (figure 38) et donc les quantités relatives (tableau 11) des différents polyphénols ne sont pas les mêmes dans les formes Me et Aq . Il parait donc raisonnable de supposer que la compartimentation des polyphénols dépend non seulement du végétal mais du type de polyphénol .

Après avoir mis en évidence le phénomène de compartimentation des polyphénols des feuilles de Tomate , nous avons recherché ce même phénomène dans les préparations chloroplastiques correspondantes . Comme dans le cas du Melon , figure 34 et 35 , nous avons dû traiter des quantités importantes de chloroplastes afin de pouvoir analyser les polyphénols par spectroscopie (figure 39) ou après chromatographie (figure 40) . Nous avons seulement dosé la rutine et l'acide chlorogénique . Comme dans les feuilles , nous avons constaté que les quantités relatives de rutine et d'acide chlorogénique présentes dans les deux compartiments (forme Me et forme Aq) sont différentes . Nous avons observé quantitativement ces variations par densitométrie sur couche mince ; les résultats des dosages sont présentés sur le tableau 11 . Comme les spectres des formes Me et

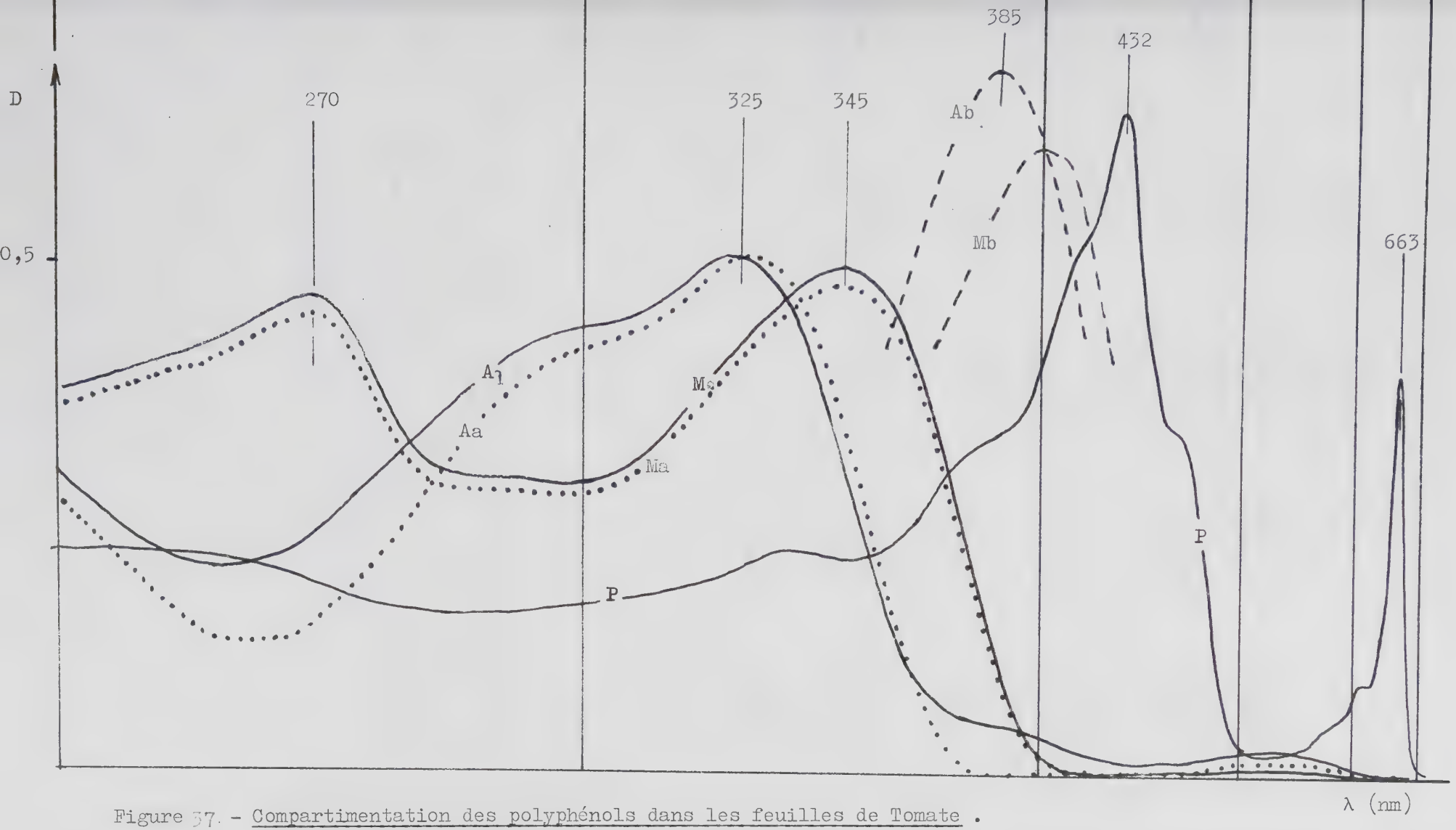


Figure 37. - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles de Tomate .

(Protocole d'expérience voir figure 35 , extraits de 200 mg de feuilles sèches - éther de pétrole-2% méthanol (P) , méthanol (M_1) et eau (A_1) . Les extraits aqueux et méthanoliques ont été alcalinisés (Ab , Mb) puis immédiatement reacidifiés (Aa et Ma) .

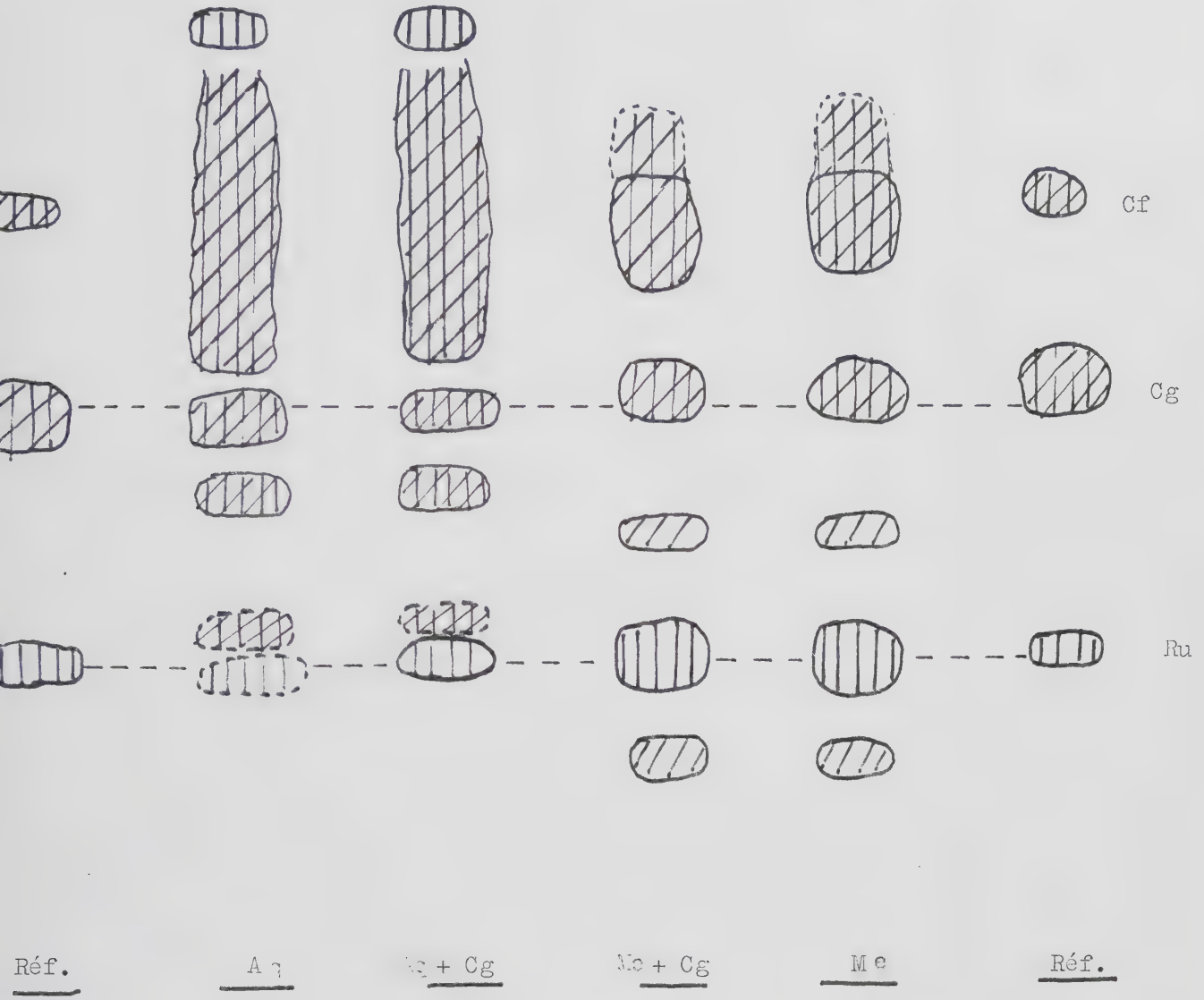


Figure 30 - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles de Tomate .

Comparaison par chromatographie sur couche mince (Cell MN 300 , ac. Acétique 10%) des formes (Ac) et (Me) par chromatographie avec l'acide chlorogénique (Cg) et référence (Réf.) avec un mélange Rutine (Ru) , acide caféique (Cf) et acide chlorogénique . Les taches des composés identiques par chromatographie sont reliées par un pointillé , celles de composés présents à l'état de traces sont entourées d'un pointillé .

Charge : 10 µl d'extrait méthanolique ou Aqueux correspondant à 4 mg de feuilles .

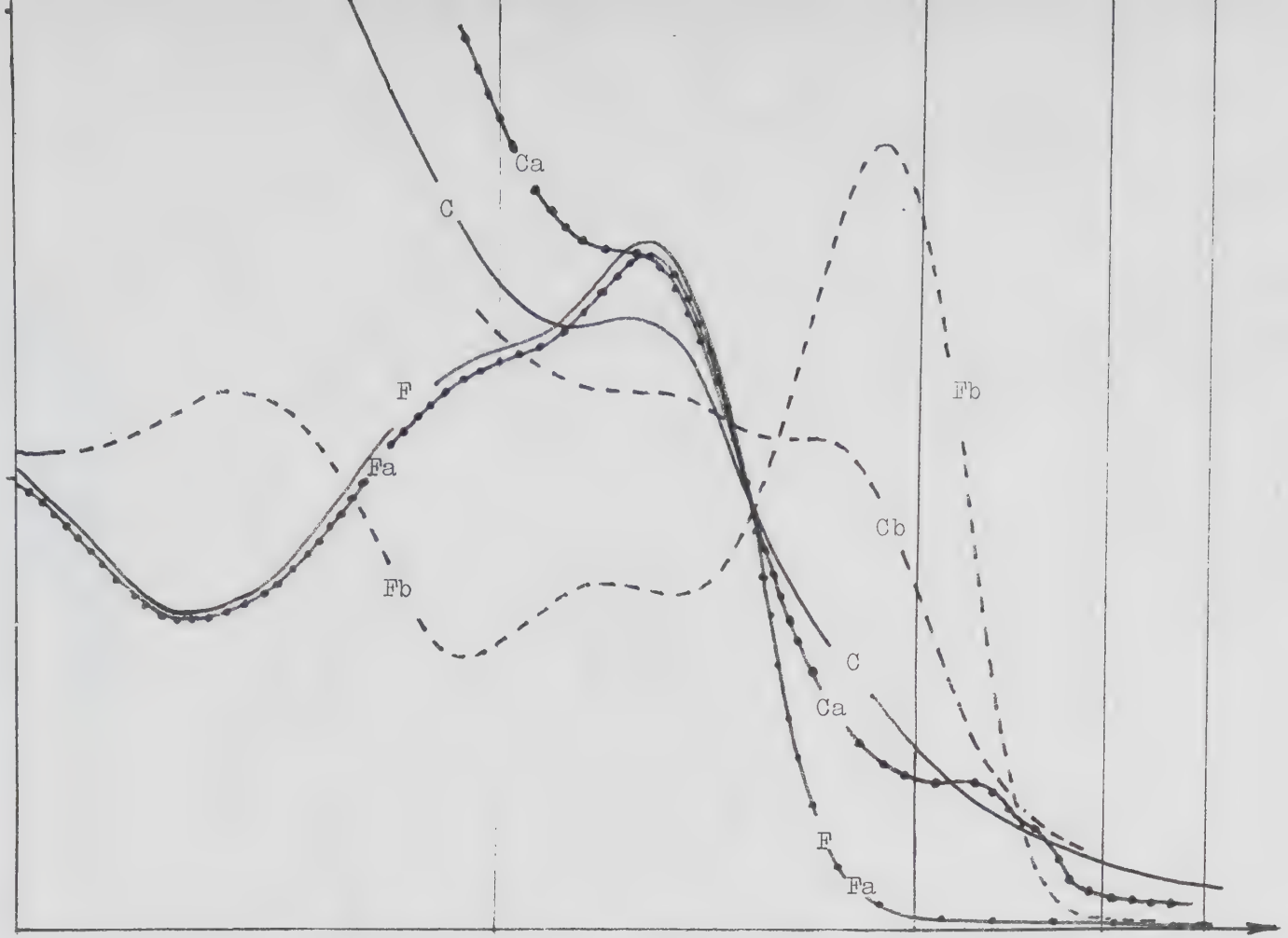


Figure 39 - Spectres d'absorption des extraits aqueux (forme A) des feuilles et préparations chloroplastiques de Tomate .

L'extrait aqueux , F , de feuilles (50 ml pour 200 mg de matière sèche) et celui , C , de chloroplastes (25 ml pour 1g de matière sèche) ont été acidifiés immédiatement après extraction (courbes pointillées Fa et Ca) puis alcalinisés (courbes en tiret Fb et Cb) . Le déplacement spectral induit par alcalinisation est totalement reversible par acidification .

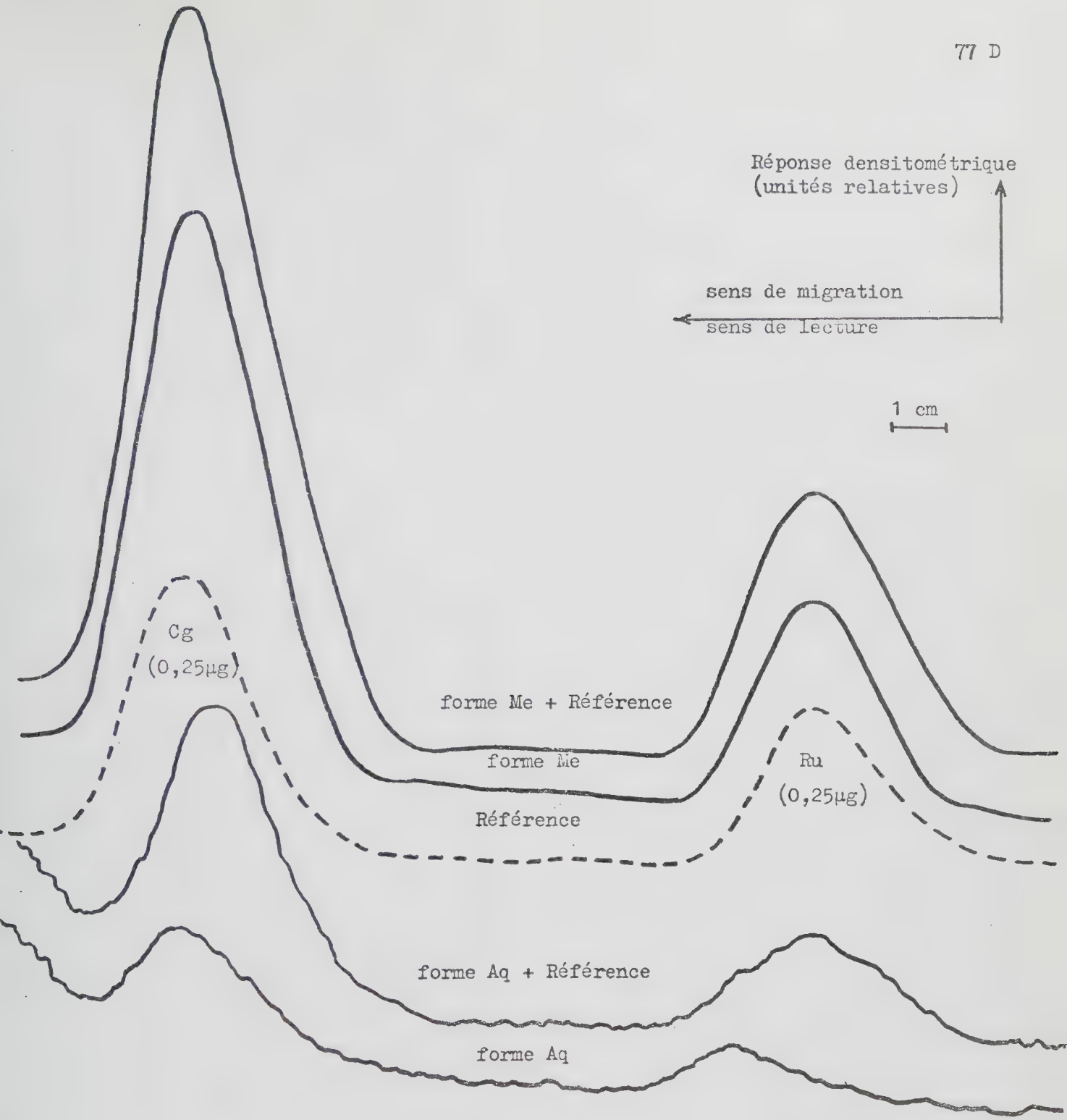


Figure 40 - Comparaison par densitométrie sur couche mince des formes Me et Aq de feuilles de Tomate .

Séparation sur couche mince de cellulose MN 300 (acide acétique 5%) ; on a représenté seulement la partie de l'enregistrement densitométrique correspondant à la zone contenant l'acide chlorogénique (Cg) et la rutine (Ru) .
Courbe en pointillé : mélange de référence (Cg , Ru) , charge 0,25 µg de chaque/tache .
Courbes continues : formes Me et forme Aq seules (f. Me et f. Aq) puis cochromatographie avec la même quantité du mélange de référence . Charges de forme Me et Aq par tache correspondant respectivement à 20 et 10 mg de feuilles . Lecture densitométrique selon le protocole de la figure 4 avec amplification maximum ; seules les courbes Aq sont figurées avec le bruit de fond de lecture .

Tableau II - Importance relative de la rutine et de l'acide chlorogénique dans les formes Me et Aq extraites de feuilles de Tomate et de leurs préparations chloroplastiques .

Dosages densitométriques sur couche mince, selon le protocole de la figure 4, par référence à une solution de rutine et d'acide chlorogénique (figure 40) .

Polyphénols (µg/100 mg MS)	Feuilles		Chloroplastes	
	forme Me	forme Aq	forme Me	forme Aq
Rutine	80	8,5	7,0	0,7
acide chlorogénique	10,5	22,5	1,0	traces 0,5

Aq extraites des feuilles (figure 37) et des préparations chloroplastiques sont différentes , nous n'avons pas tenté de comparer par spectrophotométrie les quantités de polyphénols présentes dans ces compartiments . On peut cependant vérifier que les résultats densitométriques concordent avec l'interprétation donnée de la forme des spectres des extraits Me et Aq de feuilles (figure 37) : la rutine est le principal polyphénol présent dans la forme Me alors que l'acide chlorogénique est prédominant dans la forme Aq .

En conséquence , les résultats obtenus avec le Melon et la Tomate permettent de conclure qu'il existe une compartimentation des polyphénols dans les feuilles entières et les préparations chloroplastiques . Cette compartimentation n'est pas limitée aux seuls flavonoïdes . L'importance relative des différents polyphénols dans les deux compartiments isolés (forme Me et Aq) dépend non seulement du type de polyphénol mais aussi du végétal considéré . Il semble donc exister une spécificité variétale dans le déterminisme du phénomène de compartimentation .

Nous avons donc essayé de confirmer cette hypothèse en étudiant d'autres végétaux .

III - B - 2 - 4 - Compartimentation dans les feuilles et préparations chloroplastiques d'autres végétaux .

Nous avons choisi une Monocotyledone , le Blé et une Dicotylédone , l'Epinard .

L'équipement polyphénolique des feuilles de Blé est à la fois complexe et , en partie , non identifié . Parmi les composés identifiés figurent des glycosides de C-glycosylflavones (HARBORNE et HALL , 1964 - JULIAN et al. 1971) , des dérivés d'un flavonol-3',4',5'-trisubstitué : la tricine (ANDERSON , 1933 - HARBORNE et HALL , 1964) et des dérivés d'acides cinnamiques (EL BASYOUNI et TOWERS , 1964) .

Nous avons pu mettre en évidence , par extraction progressive sur colonne de feuilles de Blé lyophilisées , l'existence de deux formes Me et Aq de polyphénols extractibles respectivement par le méthanol , puis par l'eau . Les résultats sont présentés sur la figure 41 . On constate que le spectre des extraits Me et Aq ne ressemble nettement ni à celui des acides cinnamiques ni à celui des flavonoïdes comme c'est le cas pour le Melon ou la Tomate (figure 25 et 37) . Ce premier résultat , conforme avec la composition complexe de l'équipement polyphénolique

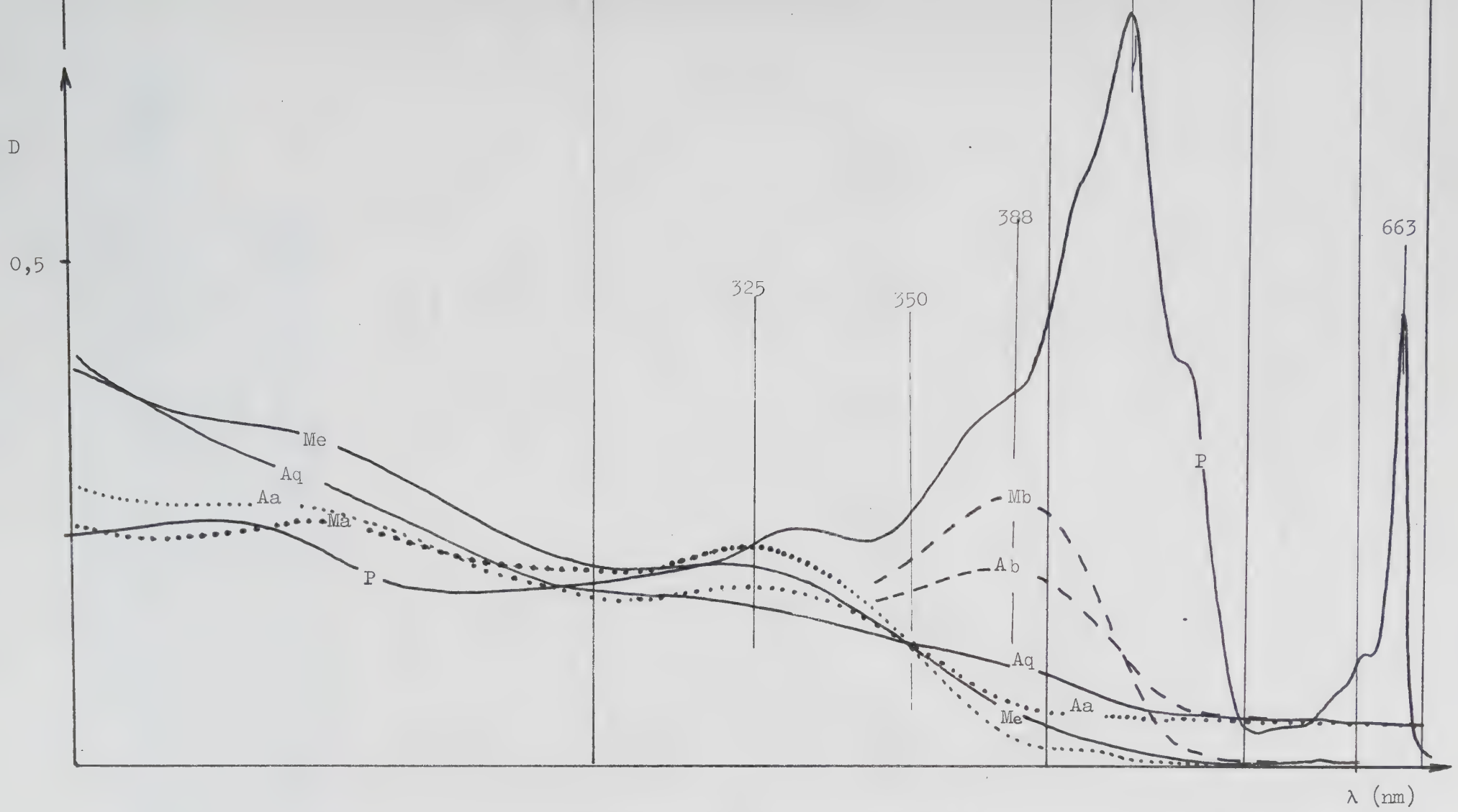


Figure 41 - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles de blé .

(Protocole d'expérience voir figure 25 , extraits successifs par l'éther de pétrole-méthanol (P) , puis le méthanol (Me) et enfin l'eau (Aq) . Déplacement spectraux des extraits méthanoliques et aqueux respectivement après alcalinisation (Mb , Ab) puis acidification (Ma , Aa) .

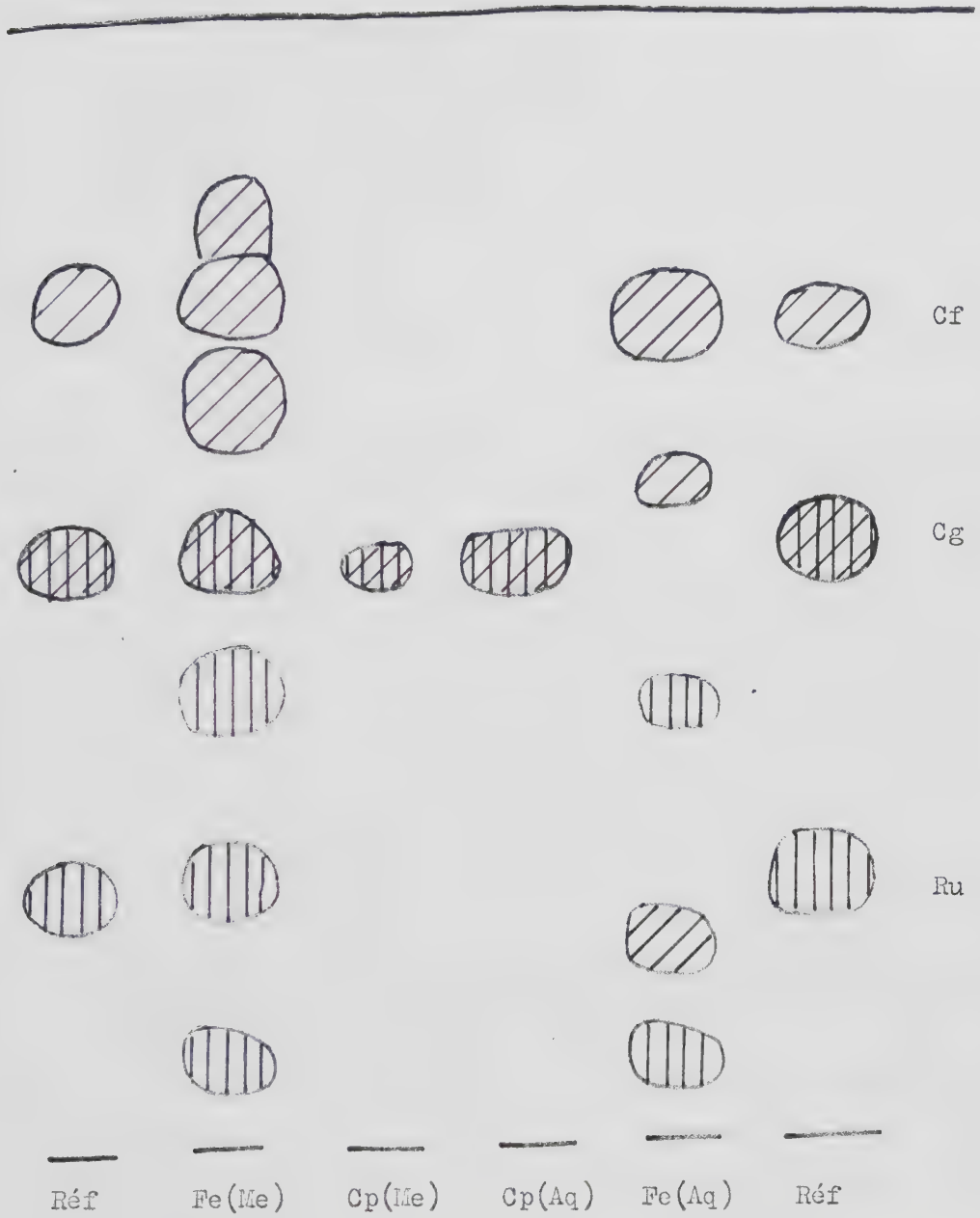


Figure 42 - Compartimentation dans les feuilles et préparations chloroplastiques de Blé (on a indiqué seulement les principales taches correspondant aux dérivés d'acides cinnamiques et de flavonoïdes contenus dans les formes (Aq) et (Me) des feuilles Fe et des chloroplastes Cp).

Séparation = couche mince cellulose MN 300 , solvant : acide acétique à 1%
Référence (Réf) = mélange Rutine (Ru) , acides chlorogénique (Cg) et caféique (Cf)
Charge par tache = extrait Me et Aq concentrés correspondant à environ 5 mg de feuilles sèches et 20 mg de chloroplastes .

du Blé , est bien confirmé lorsque l'on compare par chromatographie sur couche mince les polyphénols présents dans ces deux compartiments . Nous avons en effet constaté la présence dans ces extraits méthanoliques de nombreuses taches correspondant à des dérivés de flavonoïdes et d'acides cinnamiques (figure 42) . On peut vérifier , de plus , sur cette figure que seuls certains dérivés de flavonoïdes et d'acides cinnamiques sont présents dans les deux formes Me et Aq . Donc , chez le Blé comme chez la Tomate , le phénomène de compartimentation ne concerne spécifiquement que certains polyphénols . Nous avons recherché le même phénomène dans les préparations chloroplastiques correspondantes . Nous avons caractérisé dans les extraits méthanoliques et aqueux (figure 42) de ces préparations un même dérivé voisin de l'acide chlorogénique . Ainsi , il existe dans les préparations chloroplastiques de Blé une compartimentation particulière à certains composés phénoliques analogue à celle qui existe aussi dans les feuilles .

Nous avons enfin recherché l'existence d'une compartimentation par extraction progressive de feuilles et de préparations chloroplastiques d'Epinard . Les résultats sont présentés sur la figure 43 . Encore une fois nous confirmons donc l'existence dans les feuilles et les chloroplastes de deux compartiments de polyphénols extractibles , après élimination de l'eau tissulaire , respectivement par le méthanol , forme Me , puis par l'eau , forme Aq . Il convient de remarquer aussi , la ressemblance du spectre de l'extrait méthanolique de chloroplastes d'Epinard avec celui des autres Angiospermes (figure 23) , de Melon (figure 34) et enfin de Tomate (figure 19) .

Il est donc permis de conclure que les polyphénols , comme d'autres constituants végétaux , existent dans les feuilles et les chloroplastes sous forme de compartiments que l'on peut mettre en évidence par extraction progressive à l'aide de solvants .

Aussi après avoir montré la présence et la compartimentation des composés polyphénoliques dans les chloroplastes nous avons , pour terminer, essayé de vérifier la " possibilité d'un métabolisme (biosynthèse , interconversion , catabolisme) des polyphénols par ces organites .

III - C - Métabolisme des polyphénols par les préparations chloroplastiques .

Nous avons étudié trois activités enzymatiques correspondant à la biosynthèse (phénylalanineammonialyase = PAL) , à l'interconversion (monophénolase = MPO) et au catabolisme (flavonolase = FOA) des polyphénols . Cependant , comme les protocoles de mise en évidence de ces activités font appel à la spectroscopie dans l'ultraviolet en milieu peu absorbant , nous avons adapté ces protocoles à des recherches dans les chloroplastes .

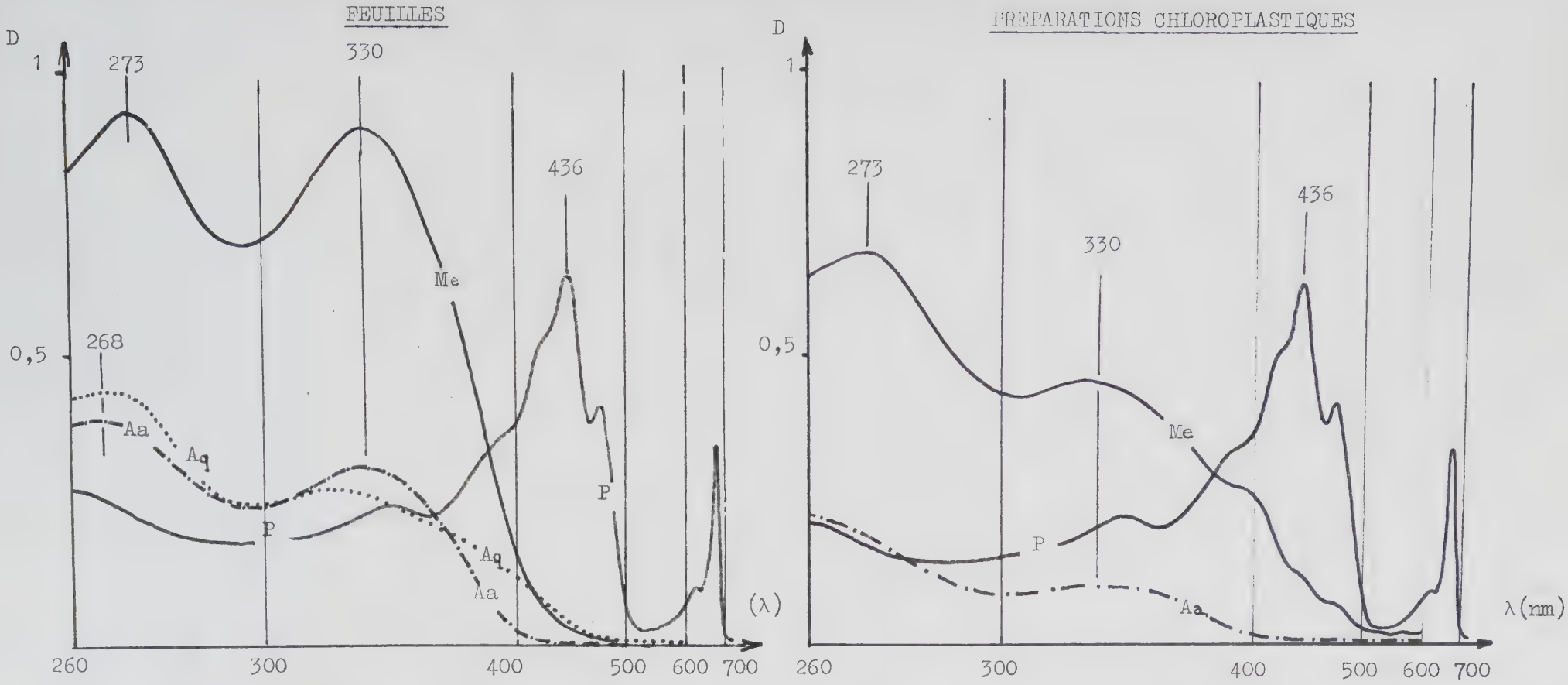


Figure 43 - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles et préparations chloroplastiques d'Epinard .

Extraction progressive sur colonne de feuilles (100 mg) et de chloroplastes (100 mg) secs selon la séquence éther de pétrole-2% méthanol (P) , méthanol (Me) , eau (Aq) . Feuilles : extrait Me en 100 ml , extrait aqueux en 50 ml avant (Aq) et après acidification (Aa) . Chloroplastes : extraits Me et Aq concentrés et repris en 5 ml de méthanol . Pigments liposolubles (P) de feuilles en 200 ml , de chloroplastes en 500 ml .

III - C - 1 - Activités enzymatiques dans les feuilles et les préparations chloroplastiques .

Comme source de référence d'activité PAL , nous avons choisi la poudre acétonique de tranches de tubercule de Pomme de terre dans lesquelles l'activité PAL est induite par éclairement (ZUCKER , 1965) . Nous avons constaté , de plus , la présence dans cette poudre des deux activités MPO et DPO de la phénolase et enfin de flavonolase .

Nous avons ensuite recherché ces mêmes activités dans les poudres acétoniques de feuilles en utilisant celle de tubercule de Pomme de terre , pour mettre en évidence d'éventuels inhibiteurs . Par contre , nous avons renoncé à utiliser des poudres acétoniques de chloroplastes qui donnent des résultats peu reproductibles sur de faibles activités et difficiles à extrapoler in vivo . Il est bien établi , en effet , que l'activité des enzymes peut être modifiée par liaison avec des structures insolubles (ENGASSER et HORVATH , 1973) et il est vraisemblable qu'il en va de même avec les enzymes associées aux structures organisées des chloroplastes dont l'activité peut être modifiée lors de la préparation des poudres acétoniques . Pour la même raison , le charbon actif inhibant l'activité MPO de la phénolase , de façon parfois réversible (ONSLOW et ROBINSON , 1928) , nous n'avons employé ce produit que pour l'étude d'ammonialyases (figure 6) . Enfin les chloroplastes étant isolés en tampon phosphate 0,1 M , nous avons choisi ce tampon pour rechercher ces activités enzymatiques après ajustement éventuel au pH optimum . En effet , ce tampon est préférable (EREZ , 1973) au tampon borate classique (KOUKOL et CONN , 1961) pour mettre en évidence non seulement la PAL , mais encore d'autres activités telle que la MPO (NELSON et DAWSON , 1944) parce qu'il ne forme pas de complexes avec les groupements ortho-diphénols .

Nous avons donc adapté les méthodes de caractérisation des trois activités dans les poudres acétoniques de feuilles avant de rechercher ces mêmes activités , directement dans les préparations chloroplastiques après isolement sur couche mince de leur produit de réaction .

III - C - 1 - 1 - Cas de la phénylalanineammonialyase (PAL)

Nous avons tout d'abord mis en évidence par spectroscopie (figure 6) la présence d'activité PAL dans la poudre acétonique de feuilles de Blé , confirmant les résultats de YOUNG et NEISH (1966) , puis dans celle de Melon.Au contraire , nous n'avons jamais observé d'activité PAL dans celle de Tomate . Nous avons pu expliquer ce fait par la présence , dans ces

feuilles d'un inhibiteur compétitif de la PAL (figure 44) que nous n'avons pas pour le moment cherché à identifier . Il convient de remarquer que l'existence d'inhibiteurs endogènes de la PAL a été rapportée dans d'autres plantes (YOUNG et al. 1966) . Ensuite , nous avons , dans tous les cas , caractérisé l'activité PAL après séparation sur couche mince de l'acide trans-cinnamique soit par chromatographie (R_F = 0,59 sur cellulose MN 300 dans l'acide acétique à 10%) , soit par électrophorèse haute tension (parcours = 5 cm en 30 minutes sur cellulose MN 300 en tampon borax sous 1000 volts/20 cm) .

III - C - 1 - 2 - Cas des activités MPO et DPO de la phénolase .

Nous avons de la même façon mis au point la recherche de l'activité MPO de la phénolase . Dans un premier temps , nous avons déterminé les conditions de mise en évidence des activités MPO sur l'acide p-coumarique et DPO sur l'acide caféique , ces conditions sont précisées sur la figure 45 . Pour mettre au point le protocole , nous avons utilisé la phénolase du tubercule de Pomme de terre et la phénolase purifiée " WHORTHINGTON " extraite de champignon de couche . Dans les deux cas , nous avons observé l'existence d'une phase de latence de durée variable pour l'activité MPO et d'une " autoinhibition par fonctionnement " (MASSON , 1955) , même à saturation d'oxygène , de l'activité DPO (figure 45) . Nous avons obtenu les mêmes types de résultats en employant des extraits enzymatiques de feuilles de Melon , de Blé et de Tomate . Lors de la recherche d'activité MPO avec l'acide p-coumarique , nous avons vérifié dans tous les cas la formation d'acide caféique après séparation sur couche mince , soit par chromatographie (cellulose MN 300 - acide acétique 10% - R_F = 0,38) , soit par électrophorèse sous haute tension (cellulose MN 300 - tampon borax - 1000 volts/20 cm - 30 minutes - parcours = 8 cm) .

III - C - 1 - 3 - Cas de la Flavonolase (FOA)

Dans les mêmes conditions , nous avons enfin recherché une activité " flavonolase " (HÖSEL et BARZ , 1972 - HÖSEL et al. 1972) dans les poudres acétoniques de feuilles , par spectroscopie entre 300 et 500 nm , et selon les protocoles précisés sur les figures 46 et 47 . Nous avons observé dans les feuilles de Melon (figure 46) , de Blé (figure 47) , mais aussi dans celle de Tomate , d'Orge et dans la poudre acétonique de tubercule de Pomme de terre la présence d'activité FOA . Nous avons vérifié que l'activité FOA extraite de ces poudres acétoniques est détruite en quelques minutes à 100°C et , en quelques jours à 4°C ; par contre , elle se conserve plusieurs mois à - 25°C dans les poudres acétoniques . Il convient de souligner que la présence d'activité FOA dans les tubercules de Pomme de terre ne paraît pas résulter d'une contamination micro-

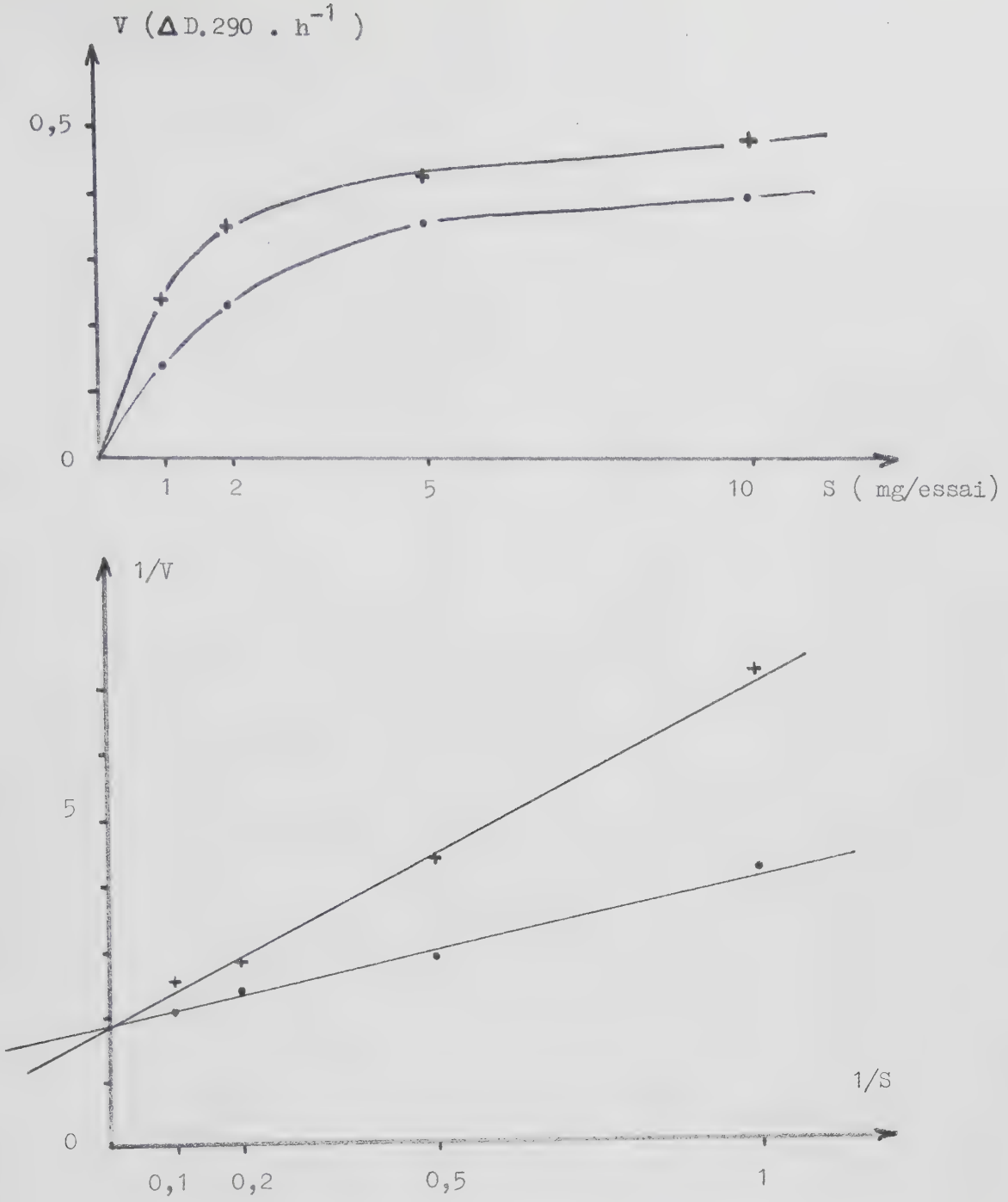


Figure 11 - Inhibition de l'activité PAL de poudre acétonique de tubercule de Pomme de terre par l'extrait de poudre acétonique de [illegible] feuilles de Tomate .

Volume total d'essai : 11 ml , contenant 4 ml et 2 ml d'extrait de Pomme de terre et de Tomate respectivement et de la DL phénylalanine.
Vitesse de réaction : variation de la densité optique D à 290 nm (ΔD . 290 nm . h^{-1}) par heure mesurée selon le protocole de la figure 6 .
Courbes : en point (•) - Essai contenant 2 ml d'extrait de Tomate (inhibiteur)
en croix (+) - Témoin contenant 2 ml de tampon pur (référence)

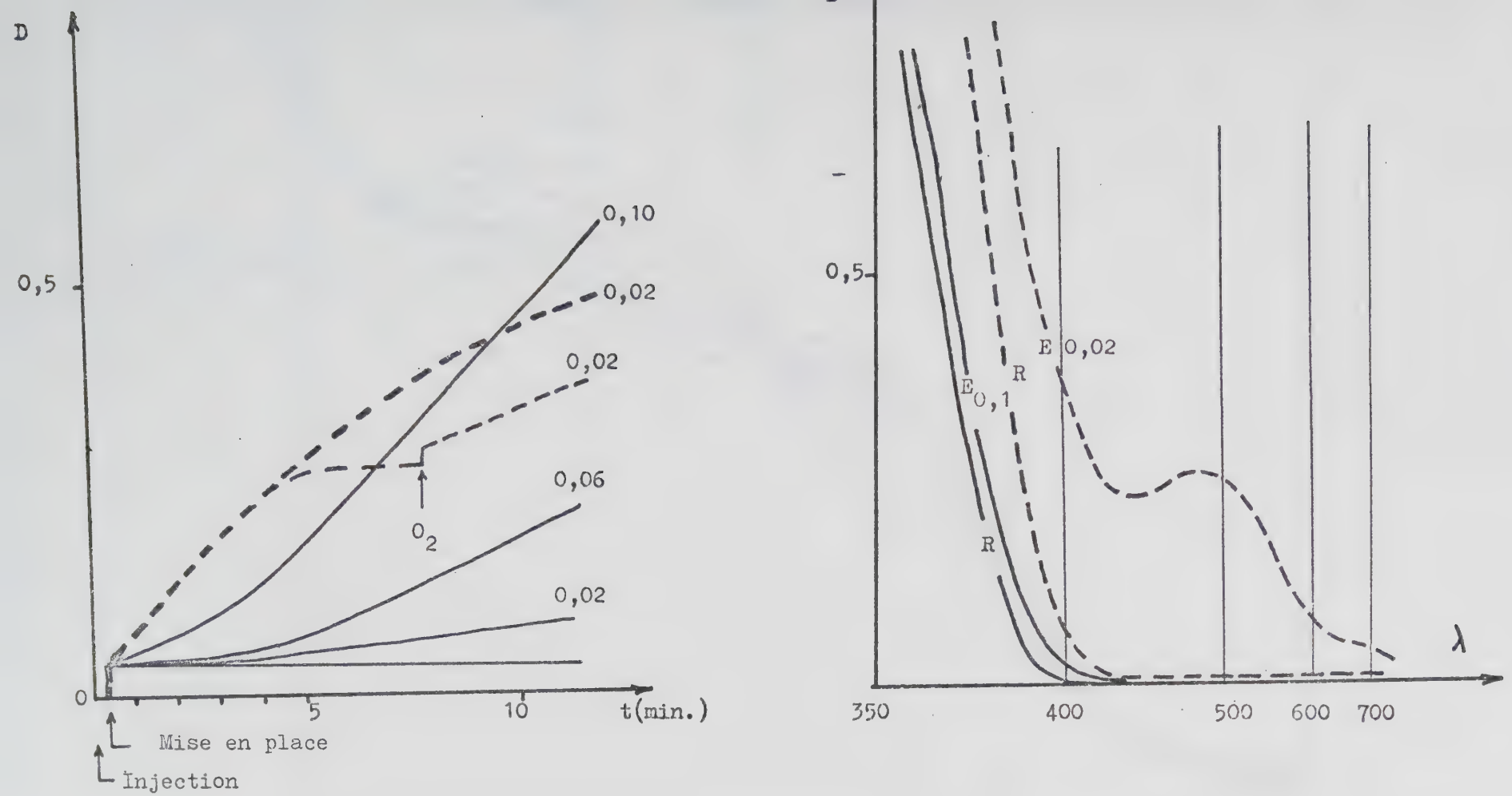


Figure 45 - Mise en évidence des activités monophénolase (MPO) et diphénolase (DPO) de la phénolase .

Enzyme = phénolase Worthington 1 mg/4 ml de tampon phosphate 0,1 M , pH = 7,0 ; Substrat MPO = acide p-coumarique (16 mg) et ascorbate de sodium (20 mg) pour 30 ml de tampon ; Substrat DPO = acide caféique (18 mg) pour 30 ml de tampon .

A gauche : cinétique de la différence de variation d'absorption à 340 nm (essai MPO = courbes continues) et à 470 nm (essai DPO = tirets) entre l'essai (E) (2,5 ml de substrat mélangé à la quantité d'enzyme indiquée sur les courbes) et la référence (R) ne contenant pas d'enzyme . Essais effectués sous barbotage d'oxygène sauf dans l'essai DPO dans lequel l'oxygène a été apporté ensuite (flèche O_2) et après enregistrement du spectre (E 0,02)(à droite) ; spectre (E 0,1) enregistré après 15 minutes .

A droite : spectre des mélanges de référence (R) et des essais (E 0,1 et E 0,02) par référence au tampon pur .

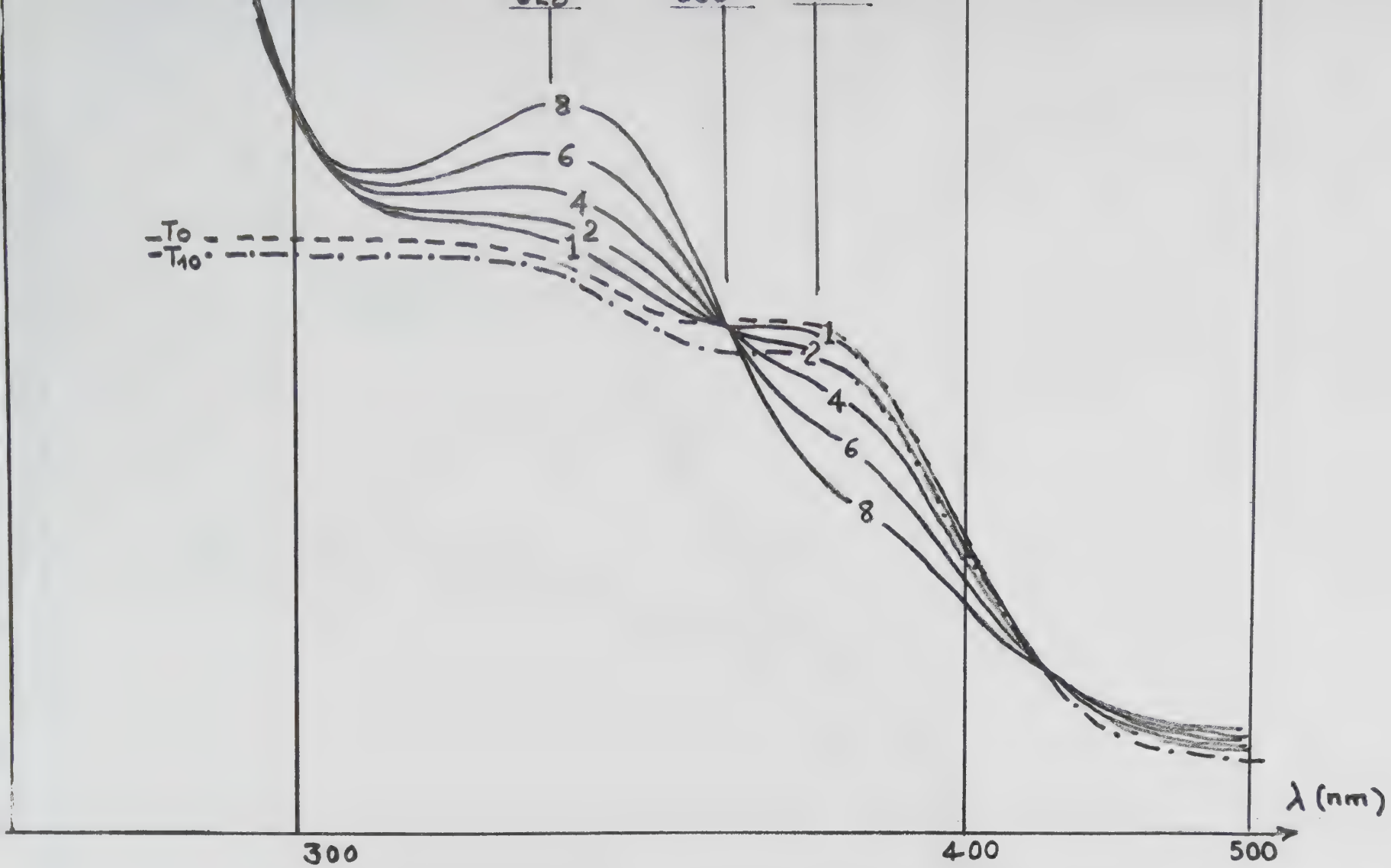


Figure 46 - DEGRADATION ENZYMATIQUE DES FLAVONOLS PAR LES EXTRAITS DE FEUILLES : MELON

Extrait Enzymatique (EE) : 500 mg de poudre acétonique par 25 ml de tampon phosphate 0,1 M - pH 7,5 - 1% EtSH .

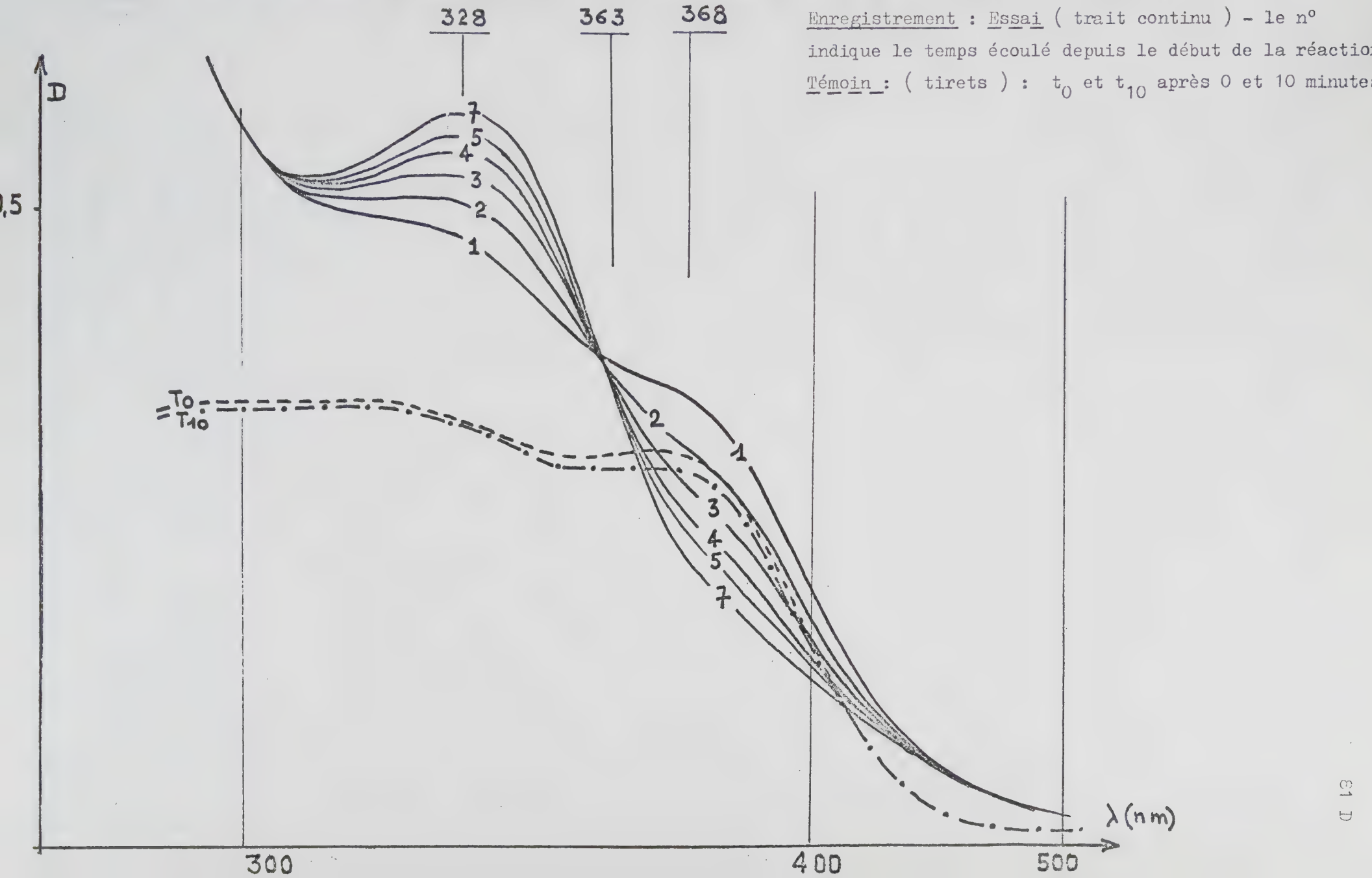
Essai : 1 vol. de solution de kaempférol (15 µg/ml) pour 1 vol. EE .

Témoin : 1 vol. de solution de kaempférol pour 1 vol. de tampon ou 1 vol. de EE bouilli (10 minutes) .

Enregistrement : Essai (trait continu) - le n° indique le temps écoulé depuis le début de la réaction ; Témoin (tirets : t_0 et t_{10} après 0 et 10 minutes .

Essai : 1 vol. de solution de kaempférol (15 µg/ml) pour 1 vol. EE .

Témoin : 1 vol. de solution de kaempférol pour 1 vol. de tampon ou 1 vol. de EE bouilli (10 minutes) .



Enregistrement : Essai (trait continu) - le n° indique le temps écoulé depuis le début de la réaction;

Témoin : (tirets) : t_0 et t_{10} après 0 et 10 minutes.

bienne pendant l'induction , puisque celle-ci a été faite en présence de sulfate de néomycine selon ZUCKER (1965) . Nous avons vérifié dans ce dernier cas , que la flavonolase est active non seulement sur le kaempférol, mais aussi sur la quercétine et la fisétine (3,7,3',4'-tétrahydroxyflavone) Ces résultats complètent donc ceux de HÖSEL et al. (1972) . Ils permettent de conclure que l'activité flavonolase existe non seulement dans les feuilles et les organes souterrains de plantes contenant uniquement des flavonols , telles que la Tomate et la Pomme de terre , mais aussi , dans les plantes contenant parfois seulement des flavones telles que le Blé , l'Orge et le Melon . Nous avons essayé ensuite de séparer le produit (dihydroflavonol ?) formé par action de la flavonolase sur le kaempférol en suivant le protocole de HÖSEL et BARZ (1972) . Nous n'avons pu isoler ce produit et donc doser par densitométrie , l'activité FOA . De ce fait nous avons laissé en suspend la recherche de cette activité dans les chloroplastes en nous limitant donc à la PAL et à la MPO .

III - C - 2 - Présence d'activité PAL dans les préparations chloroplastiques .

Nous avons recherché l'activité PAL dans les surnageants et les préparations chloroplastiques de Melon , de Blé et de Tomate . Les surnageants ont été purifiés par tamisage moléculaire sur Sephadex . Nous avons vérifié en ajoutant de la rutine aux surnageants que le tamisage pratiqué dans les conditions décrites plus haut suffit pour éliminer en totalité les flavonoïdes des surnageants (MINAMIKAWA et URITANI , 1965 - KLEIN-EUDE , 1973) . Cette purification est indispensable puisque les polyphénols sont des inhibiteurs de la PAL (CAMM et TOWERS , 1973) . Dans la Tomate , et malgré le tamisage , nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité PAL . Ce résultat permet donc de conclure que l'inhibiteur endogène n'est pas un composé polyphénolique à moins que celui-ci ne soit associé à des constituants de masse moléculaire élevée , du type protéine par exemple . Au contraire nous avons trouvé dans les surnageants de Melon et de Blé une nette activité PAL que nous avons donc comparé par densitométrie sur couche mince à celle des chloroplastes (figure 48 et 49) . A cette fin , les culots chloroplastiques isolés, à partir de 20 à 30 g de feuilles, et lavés ont été incubés , après mélange volume à volume , avec une solution de phénylalanine pour les essais (E) ou avec du tampon (Tem)(figure 48 et 49) . Compte-tenu du bruit de fond moyen , la détection (figure 48) et le dosage (figure 4) de 0,5 µg d'acide cinnamique par tache est possible , le seuil de détection de l'ordre de 0,1 µg , correspond environ à 0,1 nM d'acide cinnamique . Si l'on admet que la cinétique de l'activité PAL des chloroplastes est linéaire , comme celle de la PAL en solution (figure 5) , on peut exprimer ces mesures d'activité PAL en unités (UP)

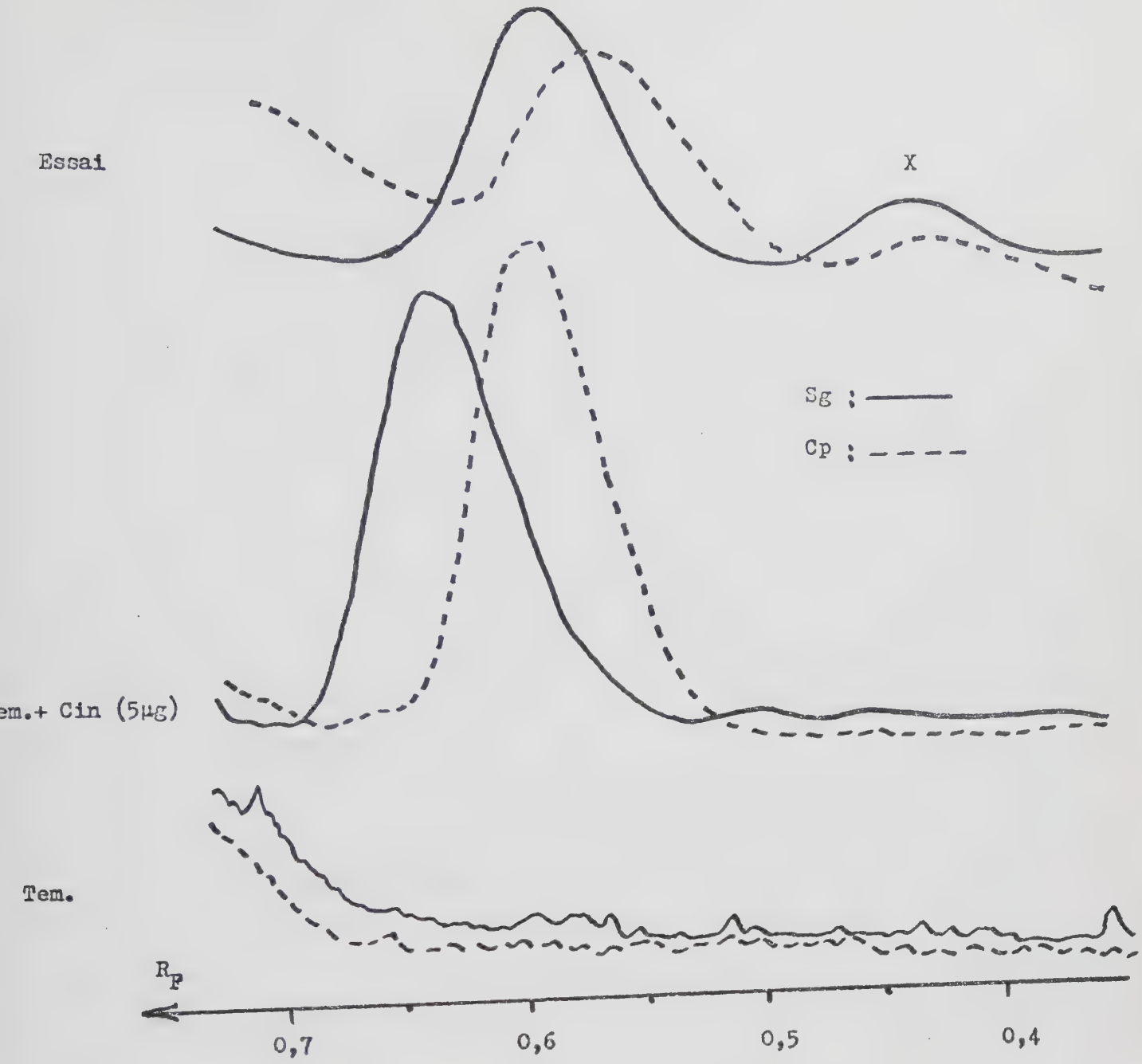


Figure 48 - Dosage réflectométrique de l'acide cinnamique (Cin) formé dans les préparations chloroplastiques (Cp) et les surnageants purifiés (Sg) de feuilles de Melon après séparation sur couche mince (Cellulose MN 300, ac. acétique 10%).

Les courbes ont été calquées en négligeant le bruit de fond, sauf dans le cas des courbes (Tem.)

Incubation : 4 heures à 40°C à l'obscurité ; substrat D,L phénylalanine à 10 mg/ml ; tampon phosphate 0,1M , pH 8,5 ; autres conditions dans le texte . Cochromatographie avec l'acide cinnamique (Cin) .
Tem = essai témoin

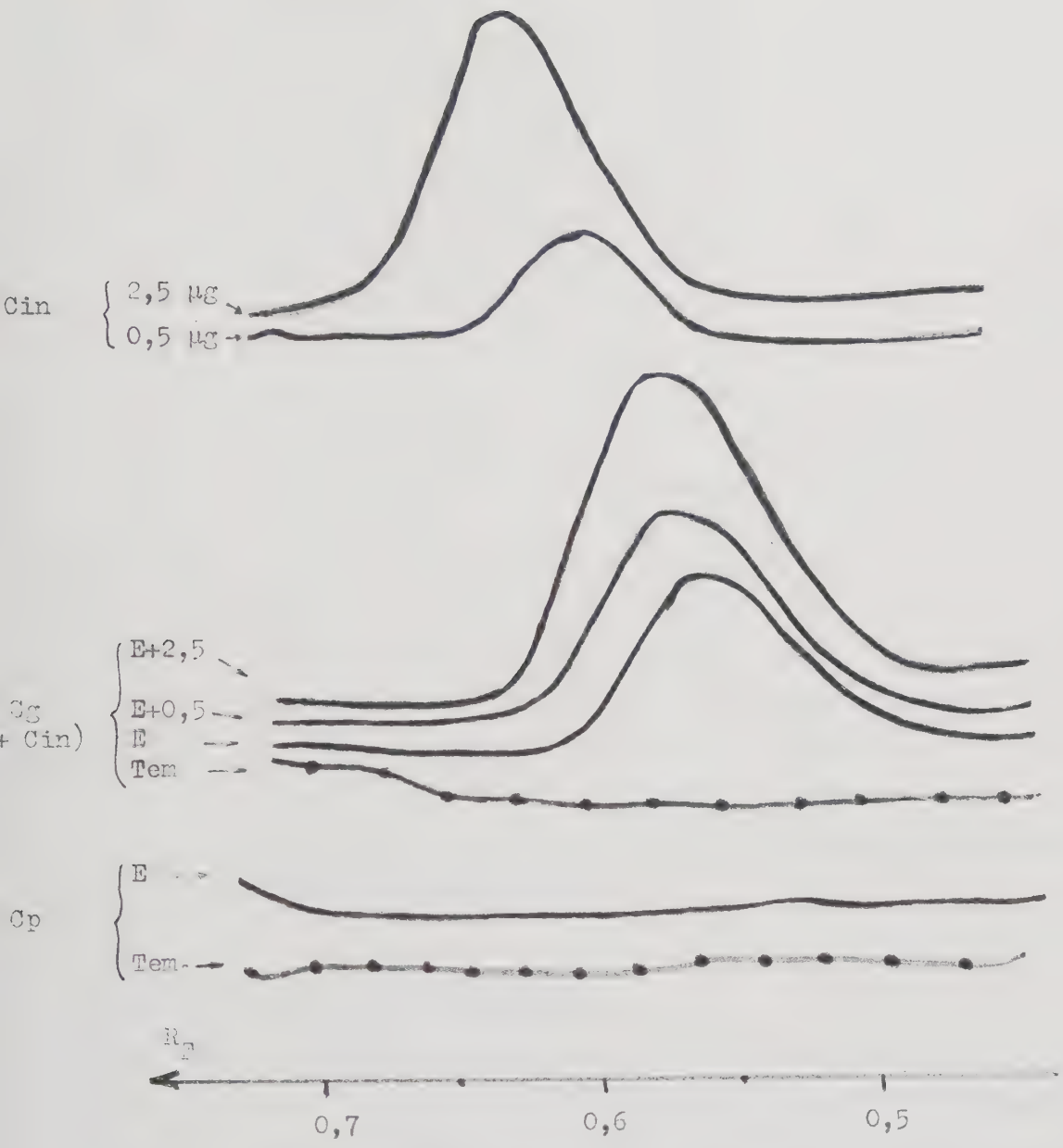


Figure 19 - Dosage réflectométrique de l'acide cinnamique (Cin) formé dans les préparations chloroplastiques (Cp) et les surnageants purifiés (Sg) de feuilles de Blé après séparation sur couche mince (Cellulose MN 300 , ac. acétique 10%)

Incubation : 4 heures à 40° à l'obscurité ; substrat : D,L phénylalanine à 10 mg/ml ;

Tampon : phosphate 0,1 M , pH 8,5 ; autres conditions dans le texte . Cochromatographie avec l'acide cinnamique (Cin) .

E = Essai ; Tem = Témoin

PAL , (tableau 12) . En comparant les courbes des figures 48 et 49 , on peut constater l'existence d'une activité PAL dans les surnageants de Melon et de Blé et seulement dans les chloroplastes de Melon . Bien que ces expériences aient été répétées six fois , nous n'avons jamais pu détecter d'activité PAL dans les chloroplastes de Blé . Il convient de remarquer que , dans certains essais , il a été impossible de mettre en évidence l'activité PAL dans les surnageants , et a fortiori dans les chloroplastes tant chez le Blé que le Melon . Cependant , bien que les chloroplastes de Blé et de Melon aient été isolés et lavés de la même façon , leurs activités PAL diffèrent beaucoup plus que ne diffèrent celles de leurs surnageants homologues . Il paraît raisonnable de conclure que la présence de PAL dans les chloroplastes de Melon ne résulte ni d'une contamination par des levures , ni par d'autres organites cellulaires , ni d'une agrégation ou d'une adsorption de la PAL sur les chloroplastes pendant leur isolement . Ces résultats complètent les résultats de LOFFELHARDT et al. (1973) qui ont trouvé une activité PAL associée aux thylakoïdes des chloroplastes de onze végétaux supérieurs et inférieurs (Algues et Mousses) . Utilisant une méthode isotopique beaucoup plus sensible que la nôtre , ces auteurs ont pu observer la présence de PAL dans les thylakoïdes du Blé . Il convient de remarquer cependant que l'activité PAL trouvée dans les chloroplastes ne représente qu'une très faible partie , inférieure à 10% , de l'activité PAL dosable dans les surnageants ; quoiqu'il en soit , ces résultats confirment la présence d'activité PAL dans les chloroplastes .

III - C - 3 - Présence d'activité MPO dans les préparations chloroplastiques .

Nous avons recherché ensuite les activités MPO et DPO de la phénolase dans les préparations chloroplastiques et dans les surnageants purifiés comme précédemment par tamisage moléculaire . Compte-tenu du fait que l'activité DPO dépend du mode de préparation et de conservation ("vieillissement" des chloroplastes) nous avons seulement vérifié l'existence de l'activité DPO par spectroscopie selon le protocole décrit dans la figure 41 . Comme , de plus , il est bien établi que les ortho-diphénols sont photooxydés par les chloroplastes sans qu'intervienne la phénolase (TREBST et ECK , 1963) , nous avons recherché cette activité à l'obscurité . Dans ces conditions , nous avons observé la présence d'activité DPO dans les surnageants et dans les chloroplastes de Tomate et de Melon (tableau 13). Au contraire , il a été impossible de mettre en évidence , par spectroscopie , une activité DPO chez le Blé . La même observation a été récemment rapportée par TOLBERT (1973) . Nous avons de plus vérifié , par addition

Tableau 12 - Activité PAL dans les surnageants et les préparations chloroplastiques de feuilles fraîches (Ff) de Blé et de Melon .

1 unité PAL ≡ UP = 1 nM d'acide cinnamique formée par heure par les chloroplastes ou le surnageant purifié correspondant à 1 g Ff .

Activité PAL (UP)	Surnageant (Sg) (5 ml Sg/g Ff)	Chloroplastes (Cp) (100 à 150 mg Chl dans Cp/g Ff)
Blé	118,0	non détectable (inférieure à 0,1)
Melon	202,0	12,8

Tableau 13 - Activités MPO et DPO dans les préparations de chloroplastes (Cp) et les surnageants (Sg) de Blé , de Melon et Tomate et conditions de mise en évidence .

Activités : + = présente ; (+) = faible ; - = nulle

Plante	Activité	Cp	Sg	Conditions de mise en évidence
Tomate	DPO	+	+	extraits frais
	MPO	+	+	extraits frais
Melon	DPO	(+)	(+)	seulement après vieillissement (4°C,48h)
	MPO	+	+	extraits frais
Blé	DPO	-	-	aucune activité à l'obscurité absence d'inhibiteur par rapport à la phénolase Worthington (figure 45)
	MPO	+	(+)	extraits frais

de phénolase aux extraits de Blé , que dans les conditions de dosage décrites dans la figure 45 , ces extraits ne présentent aucune activité inhibitrice vis à vis de l'activité DPO de la phénolase exogène . Dans ces conditions , il paraît raisonnable de conclure à l'absence d'activité DPO chez le Blé . Il convient de remarquer que TOLBERT (1973) a signalé une activité DPO des chloroplastes de Blé avec la 3,5-dihydroxyphényl-alanine (dopa) comme substrat (tableau 3) . Cependant cet auteur a observé que les chloroplastes de Blé n'ont pas d'activité DPO à l'obscurité , quel que soit leur état de vieillissement , et qu'ils sont seulement capables d'oxyder la dopa à la lumière . Il paraît donc raisonnable de supposer que l'activité DPO , ainsi mise en évidence , n'est pas le fait de la phénolase , mais du système de photooxydation à la lumière des ortho-diphénols décrits par TREBST et al. (1963) .

Comme de plus , l'activité DPO paraît être le plus souvent latente dans les chloroplastes et activée par vieillissement , il nous a paru plus important de rechercher l'activité MPO . Nous avons mis en évidence cette activité en isolant , par chromatographie et par électrophorèse , l'acide caféique formé par hydroxylation de l'acide p-coumarique en présence d'ascorbate . Dans tous les cas , l'activité MPO est présente dans les préparations chloroplastiques et les surnageants correspondants . Nous avons résumé les résultats dans le tableau 12 . Compte-tenu de l'existence possible d'une phase de latence de l'activité MPO , analogue à celle observée sur la figure 45 , nous avons seulement présenté les résultats concernant l'activité MPO de façon qualitative . Ces données permettent de conclure qu'il existe toujours une activité MPO dans les préparations chloroplastiques , alors qu'il n'en est pas de même pour l'activité DPO . Ces résultats concordent avec ceux de nombreux auteurs qui ont observé que l'activité DPO de la phénolase chloroplastique est souvent latente , et , généralement activée par la désorganisation des structures chloroplastiques (TREBST et ECK , 1962 - HAREL et al. 1965 - SIEGENTHALLER et VAUCHER-BONJOUR , 1971 - PARISH , 1972 - TOLBERT , 1973) . Il paraît donc raisonnable de supposer que , dans les chloroplastes , la phénolase a principalement une activité MPO .

En conclusion , l'ensemble de ces résultats permet d'affirmer qu'il existe dans les préparations chloroplastiques , au moins , deux enzymes participant à la biosynthèse des polyphénols . Ces données sont compatibles avec la biosynthèse in vitro de polyphénols par les chloroplastes rapportée précédemment . De même la présence et la compartimentation de polyphénols dans les préparations chloroplastiques conduisent à envisager tant in vitro que peut être aussi in vivo des interactions avec les activités photosynthétiques . Nous discuterons donc maintenant ces points de façon plus générale .

IV - DISCUSSION GENERALE , CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Avant de discuter les résultats concernant le métabolisme des polyphénols nous ferons quelques remarques concernant les C-glucosylflavones identifiées dans les feuilles de Melon . Nous envisagerons ensuite les données concernant la localisation et la compartimentation des polyphénols . Nous tenterons enfin de dégager quelques relations entre polyphénols et photosynthèse en rapprochant ces observations des données fonctionnelles rappelées précédemment .

IV - 1 - Structure des mélosides .

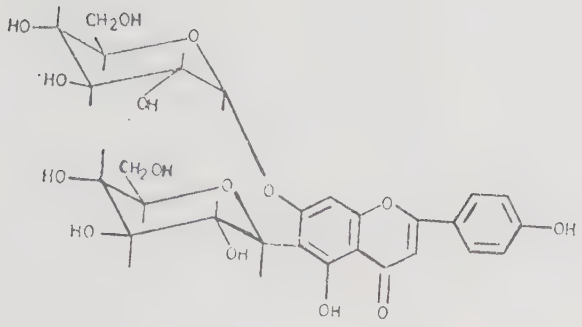
Nous avons , dans ce travail , établi la présence de C-glucosylflavones dans les feuilles de Melon . A notre connaissance , la présence de ce type de flavone n'avait pas encore été rapportée dans cette plante . La présence de C-glycosylflavones dans la famille des Cucurbitacées n'a été semble-t-il rapportée qu'une seule fois , par PARIS et al. (1966) dans les feuilles de Bryone . Nous avons confirmé et précisé ce résultat (MONTIES , 1972 c) . Il est remarquable que la présence de flavonols ait été aussi rapportée chez d'autres Cucurbitacées : dans les cotylédons de plantules de Cucurbita maxima Duchesne (STRACK et REZNICK , 1972) ainsi que dans certaines variétés de Cucumis (BROWN et al. 1969) . Ces derniers auteurs ont observé dans les feuilles de 21 espèces de Cucumis la présence de dérivés de flavones et de flavonols , non identifiés et qui auraient une signification chimio-taxinomique . Dans les feuilles de Cucumis melo cultivar Doublon (RISSER G.) nous avons trouvé uniquement des dérivés de C-glucosylflavones .

Nous avons isolé et purifié par chromatographie sur papier et sur couche mince de cellulose quatre flavonosides que nous avons appelé mélosides A , L , l et a . La teneur moyenne en mélosides des feuilles de Melon est de l'ordre de 5 mg pour 100 mg de feuilles sèches . Nous avons identifié ces mélosides par référence à des flavones et C-glycosylflavones que nous avons purifiés par ailleurs . Nous avons étudié leur structure en combinant les résultats d'analyses physiques (spectroscopie ultraviolette et infrarouge , comportement électrophorétique et chromatographique , spectroscopie de masse) et d'analyses chimiques (formation de complexes , hydrolyses acide , alcaline et enzymatique) . L'ensemble de ces données physico-chimiques nous ont conduit à proposer les formules suivantes pour les deux premiers mélosides :

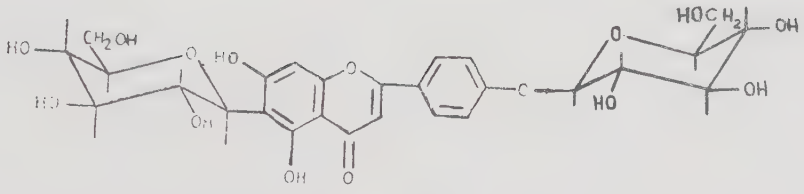
méloside A = 6 - C-glucosidoglucosyl-apigénine

méloside L = 6 - C-glucosidoglucosyl-lutéoline

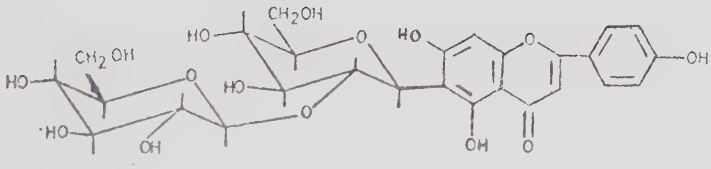
Toutes les propriétés de ces deux corps , notamment celles obtenues par spectrométrie de masse , concordent avec les formules proposées . Chacun des mélosides A et L représente en moyenne 30 à 40 pour cent de



Saponarine



Isosaponarine



Méloside A

Figure 50 - <u>Structure des C-glucosido-glucosyl-flavones isomères de la saponarine , isosaponarine et méloside A</u> .

(Le site des liaisons osidiques sur les glucoses est hypothétique) .

La lutonarine , l'isolutonarine , le méloside L sont les molécules homologues , B-<u>ortho</u>-dihydroxylées , de la saponarine , isosaponarine et du méloside A .

la totalité des mélosides contenus dans les feuilles . En conséquence , nous n'avons pu isoler que de faibles quantités des deux autres mélosides l et surtout a . Nous avons identifié l'acide trans-caféique comme produit d'hydrolyse de ces deux mélosides . Les propriétés chimiques du méloside l concordent avec celles d'un dérivé acylé par l'acide caféique du méloside L . Il paraît raisonnable d'admettre pour ce corps la formule :

méloside l = 6 - C-cafeyl-glucosidoglucosyl-lutéoline

La structure du méloside a , dont on a isolé que de trop faibles quantités, reste hypothétique . Les propriétés de ces deux derniers mélosides sont cependant très voisines .

Ainsi les mélosides A et L constituent un nouveau couple de glucosides de C-glucosylflavones . Nous avons présenté sur la figure 50 leurs structures développées en les comparant à celles de deux O-glycosides de C-glycosylflavones : la saponarine ainsi que l'isosaponarine découverte par JURD et al. (1957) . L'existence de C-glycosidoglucosylflavone pourrait être assez générale puisque plusieurs autres molécules de ce type ont été décrites (WAGNER et al. , 1972) depuis que la première d'entre-elles a été découverte par HOROWITZ et GENTILLI (1966) . L'existence de C-triosyl-apigénine a été rapportée par WEISSENBOCK (1973) dans les feuilles de deux variétés d'Avoine . Il est possible que le composé F_3 , décrit comme l'apigénine-8-C-glucosylglucoside (WEISSENBOCK et al. 1972) soit la forme transposée de 6 en 8 du méloside A .

L'existence du méloside L , qui est le dérivé homologue 3'-hydroxylé du méloside A est peu surprenante . Nous avons rappelé que l'on observe généralement ces couples de composés homologues qui pourraient être synthétisés l'un à partir de l'autre par voie enzymatique et par action MPO de la phénolase en particulier .

Au contraire , l'existence de dérivés acylés de ces flavonosides peut paraître plus surprenante . Il convient de souligner que , seulement un petit nombre de dérivés de ce type ont été décrits , souvent de façon préliminaire , à la fois dans la série des flavones (KING , 1962 - Mc CLURE , 1964 - MONTIES , 1972 c - ZOOL , 1972) et des flavonols (HORHAMMER et al. 1961 - DIETRICHS et SCHAICH , 1963 - FURAYA et GALSTON 1965 - WEISSENBOCK et al. 1972 - NAHRSTEDT et al. 1974) . Il est possible cependant , que de façon générale , ces composés soient considérés actuellement comme rares de la même façon que l'étaient , il y a seulement quelques années , les C-glycosylflavones elles-mêmes , parce qu'elles n'avaient pas été recherchées de façon systématique . Quoiqu'il en soit , la biosynthèse de ces composés serait d'autant plus importante à étudier parce que , tout au moins chez le Pois (HARPER et al. 1970) , elle pourrait dépendre de la localisation en subcellulaire du métabolisme des polyphénols . Nous discuterons donc maintenant les résultats concernant la localisation des polyphénols dans les feuilles .

IV - 2 - Présence de polyphénols dans les chloroplastes : artéfact d'adsorption ou effet du métabolisme ?

Nous avons montré , dans ce travail , la présence systématique de composés polyphénoliques , dérivés de flavoïdes et d'acides cinnamiques dans les préparations de chloroplastes d'Angiospermes . Les teneurs moyennes de ces préparations sont de l'ordre de 1 µg par mg de chlorophylle . Nous avons vérifié en tenant compte des dilutions faites lors de l'isolement des chloroplastes de Melon et d'Epinard qu'un lavage unique des culots par le tampon d'isolement suffit pour rendre négligeable la contamination de ces culots par les polyphénols des surnageants . Compte-tenu des quantités de polyphénols présentes en moyenne dans les feuilles , ce résultat semble avoir une valeur générale . Nous avons ensuite constaté que deux lavages successifs , même en milieu hypotonique , ne permettent pas d'éliminer en totalité les polyphénols contenus dans les préparations chloroplastiques . Il nous parait donc justifié d'affirmer que les préparations chloroplastiques contiennent systématiquement des polyphénols en quantités à la fois non négligeables et variables avec les conditions d'isolement .

Ces résultats peuvent être interprétés de deux façons . Ils pourraient indiquer soit que les chloroplastes constituent un site particulier de métabolisme des polyphénols , soit que les polyphénols sont adsorbés sélectivement par les chloroplastes lors de leur isolement .

Deux groupes de résultats paraissent incompatibles avec cette dernière hypothèse .

Premièrement , nous n'avons jamais observé d'augmentation de la teneur en polyphénols des préparations chloroplastiques isolées dans des milieux supplémentés en polyphénols . Les expériences ont été faites avec de la rutine dans le cas de la Tomate (figure 19) et avec un mélange des quatre mélosides dans le cas du Melon (tableau 8) . Très récemment , WEISSENBOCK et SCHNEIDER (1974) ont obtenu les mêmes résultats lors d'expériences d'incubation de chloroplastes de feuilles d'Avoine en présence des flavonosides extraits de ces mêmes feuilles . Il nous parait donc raisonnable d'exclure l'hypothèse d'un phénomène d'adsorption non spécifique des polyphénols sur les chloroplastes . Lors d'un tel processus les quantités de polyphénols adsorbés sur les chloroplastes devraient varier avec la teneur en polyphénol du milieu d'isolement .

Cependant , ces diverses expériences ne permettent pas d'exclure l'existence lors de l'isolement d'un phénomène de fixation des polyphénols sur un nombre fini de sites présents sur les chloroplastes . Un tel processus paraît peu vraisemblable parcequ'il devrait , pour rendre compte

des observations , être de plus spécifique des polyphénols particuliers qui sont différents dans chacune des plantes étudiées .

Nous avons observé en effet que si les proportions relatives de rutine et d'acide chlorogénique dans les feuilles et préparations chloroplastiques de Tomate sont voisines (tableau 10) il n'en va pas de même pour d'autres polyphénols (flavonosides et dérivés d'acides cinnamiques) qui ne sont pas spécifiquement présents dans les chloroplastes (figure 18) . De même , dans les préparations chloroplastiques de Melon nous avons constaté un enrichissement relatif en méloside a et 1 (tableau 10) sans pouvoir mettre en évidence une adsorption de rutine ajoutée éventuellement au milieu d'isolement des chloroplastes . Enfin , nous avons observé dans les préparations chloroplastiques de Blé , la présence , en quantité relativement importante , d'un seul des nombreux polyphénols présents dans les feuilles entières (figure 42) . De plus , WEISSENBOCK (1973) comparant les " chloroplastes " isolés de deux variétés différentes d'Avoine a montré qu'ils sont , par rapport aux feuilles , les uns enrichis en saponarine et les autres en un composé de type kaempférol-3-p-coumaryl-trioside .

En conséquence , comme la composition relative de l'équipement polyphénolique des préparations chloroplastiques n'est pas la même que celle des feuilles entières et comme les polyphénols particuliers présents dans ces préparations sont différents dans chacune des plantes étudiées , il nous paraît raisonnable d'exclure un phénomène de fixation " au hasard " d'une quantité limitée de polyphénols sur les chloroplastes au cours de leur isolement . En conclusion , on est donc conduit à admettre qu'il existe des composés polyphénoliques dans les préparations chloroplastiques parceque ces substances existent dans les chloroplastes .

IV - 3 - Métabolisme des polyphénols dans les chloroplastes .

La présence de polyphénols dans les chloroplastes pourrait être l'indice d'un métabolisme ou même d'une biosynthèse de ces substances dans ces organites . Cette présence pourrait aussi correspondre simplement à un dépôt de composés synthétisés dans le cytoplasme ; il en est ainsi pour de nombreux constituants des membranes et du stroma des chloroplastes . Ces deux hypothèses ne sont d'ailleurs pas exclusives . La première d'entre elles paraît être confirmée par le fait que l'on a décrit dans les culots chloroplastiques de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse des polyphénols (figure 1) .

Dans ce travail , nous avons employé une méthode originale de dosage réflectométrique dans l'ultraviolet des composés phénoliques séparés sur couche mince pour doser directement l'acide cinnamique produit par la PAL dans les feuilles et préparations chloroplastiques . Nous n'avons pas observé d'activité PAL dans les poudres acétoniques de feuilles de Tomate ;

ce résultat a été expliqué par l'existence d'un inhibiteur compétitif (figure 44) . Nous avons ensuite pu mettre en évidence une activité PAL dans les seules feuilles de Blé alors que cette activité existe à la fois dans les feuilles et les préparations chloroplastiques du Melon . Récemment LOFFELHARDT et al. (1973) ont montré , à l'aide de précurseurs radioactifs , la présence de PAL dans les préparations chloroplastiques du Blé et de 8 autres végétaux . D'après ces auteurs , la PAL serait liée étroitement aux thylakoïdes des chloroplastes . En conséquence , la présence de PAL paraît être générale dans les chloroplastes .

Nous avons ensuite étudié les activités MPO et DPO de la phénolase des préparations chloroplastiques et des surnageants purifiés du Blé , du Melon et de la Tomate . Nous avons constaté que l'activité DPO de la phénolase des préparations chloroplastiques peut être latente ou même inexistante alors qu'il a toujours été possible de mettre en évidence une activité MPO . Il nous paraît donc raisonnable de supposer que la phénolase des chloroplastes a principalement une activité MPO . Les observations récentes de TOLBERT (1973) concernant l'activité MPO de nombreuses préparations chloroplastiques confirment la conclusion précédente .

Ainsi , il parait justifié de conclure qu'il existe dans les chloroplastes au moins deux enzymes capables de métaboliser des composés polyphénoliques . Il convient d'ajouter à cela qu'une activité acide cinnamique-4-hydroxylase a été rapportée dans des préparations de chloroplastes d'Epinard séparées sur gradient discontinu de saccharose par CAMM (1972) . L'activité chloroplastique mesurée dans ces conditions représente 23 pour cent de l'activité totale (culot précipité à 10 000 g) alors que celle des peroxysomes ne s'élève seulement qu'à 7 pour cent .

L'existence de ces trois activités enzymatiques dans les préparations chloroplastiques est suffisante pour permettre la biosynthèse séquentielle d'acide p-coumarique et caféique à partir de phénylalanine (figure 1) et donc , éventuellement , une accumulation de dérivés acylés dans les chloroplastes . Or , dans ce travail , nous avons observé un " enrichissement relatif " des préparations chloroplastiques de Melon en mélosides acylés par l'acide caféique (tableau 10) . De même WEISSENBOCK (1973) a rapporté une accumulation relative d'un flavonoside acylé dans les préparations chloroplastiques d'une variété d'Avoine . Il est possible que ces derniers résultats puissent être expliqués par l'existence dans les chloroplastes d'une telle voie de biosynthèse séquentielle d'acides cinnamiques . En conséquence , il paraît raisonnable de supposer qu'au moins certains polyphénols intrachloroplastiques sont synthétisés dans les chloroplastes .

De plus , l'existence dans les chloroplastes de Lin (VOLUNIETS et PROKORCHIK , 1974) des acides 4-hydroxy-benzoïques , 3,4-dihydroxybenzoïques et 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïques homologues respectifs des acides

p-coumariques , caféique et férulique pourrait être l'indice d'un catabolisme par β-oxydation des cinnamoyl-coenzyme A correspondant , dont on a déja supposé la formation pour expliquer la biosynthèse de stilbènes (figure 1) par les préparations chloroplastiques d'Hydrangea (KINDL , 1971) . Dans ce travail , nous avons seulement étudié la possibilité d'un catabolisme des flavonoïdes . Nous avons pu mettre en évidence , dans les extraits de poudre acétonique de feuilles de Blé , d'Orge , de Melon , de Tomate (figures 46 et 47) l'existence d'une activité flavonolase mais il n'a pas été possible de rechercher cette même activité dans les préparations chloroplastiques homologues .

Ainsi , la présence dans les chloroplastes , d'une part de polyphénols de types différents et parfois accumulés spécifiquement , d'autre part d'enzymes capables de synthétiser certains d'entre eux , conduit à supposer que les chloroplastes constituent l'un des sites subcellulaires du métabolisme des polyphénols .

Enfin , avant d'examiner les relations éventuelles entre polyphénols et photosynthèse , nous discuterons les résultats concernant la compartimentation des polyphénols dans les feuilles .

IV - 4 - Compartimentation des polyphénols dans les feuilles et les chloroplastes .

Nous avons dans ce travail utilisé la méthode d'extraction progressive à l'aide de solvants pour mettre en évidence une compartimentation des polyphénols contenus dans les feuilles et les préparations chloroplastiques . Le phénomène de compartimentation se caractérise par le fait qu'un même polyphénol peut être extrait par deux solvants différents employés successivement . Nous avons mis à profit les différences d'extractibilité des polyphénols par le méthanol et par l'eau pour définir deux compartiments correspondant aux fractions solubilisées par le méthanol (forme Me) puis par l'eau (forme Aq) . C'est ainsi qu'il nous a été possible de mettre en évidence tant dans les feuilles et les préparations chloroplastiques de Melon , de Tomate , de Blé et d'Epinard , l'existence d'un phénomène de compartimentation des polyphénols . Ce phénomène n'est pas un artéfact de préparation . Nous avons pu l'observer tant sur feuilles fraîches que sur matériel lyophilisé en utilisant des séquences diverses de solvants de polarité cependant croissante . De plus , il ne semble pas exister de relation systématique entre la structure moléculaire des polyphénols et leur compartimentation éventuelle . C'est ainsi que dans les feuilles de Tomate (tableau 11) ou les préparations chloroplastiques de Blé (figure 42) la compartimentation affecte surtout les dérivés de l'acide cinnamique alors que dans les feuilles de Melon (figure 36) ou de Blé (figure 42) elle concerne plutôt certains flavonosides . En

conséquence , il pourrait exister une spécificité variétale dans le déterminisme du phénomène de compartimentation . Enfin , dans le cas des feuilles et préparations chloroplastiques du Melon tout au moins (figure 33) , l'existence de deux compartiments résulterait d'interactions entre les polyphénols et les structures insolubles des feuilles ou des préparations chloroplastiques .

Ainsi le phénomène de compartimentation dont nous avons rapporté l'existence dans les feuilles et préparations chloroplastiques de Melon (MONTIES , 1971) paraît être général . Récemment MAJAK et TOWERS (1973 a et b) ont montré qu'il est possible de séparer , par extraction progressive à l'aide d'acétone pure ou d'éthanol aqueux , puis d'eau , les dérivés d'acides cinnamiques qui sont métabolisés de façon différente au cours de la lignification . Ces expériences ont été faites sur des feuilles fraîches de Mentha arvensis et les résultats plus anciens établis ou discutés par ces auteurs permettent de penser que le même type de séparation peut être réalisé sur des feuilles de Blé fraîches ou lyophilisées . Pour le moment cependant , on ne peut que supposer l'existence d'une relation entre le phénomène de compartimentation que nous avons mis en évidence et les résultats de MAJAK et TOWERS . Il n'est donc pas encore possible d'attribuer une éventuelle signification physiologique à la compartimentation des polyphénols présents dans les feuilles et a fortiori dans les chloroplastes . Quoiqu'il en soit , il parait raisonnable de supposer que la compartimentation des polyphénols , c'est à dire l'existence de deux ou même plusieurs formes Me ou Aq (figure 31) , résulte de la formation d'associations moléculaires de stabilités différentes entre les polyphénols et les structures des feuilles et de chloroplastes .

Une telle hypothèse est tout à fait compatible avec les divers effets observés in vitro ou attribués in vivo aux composés polyphénoliques . Pour terminer nous envisagerons donc quelque relations entre polyphénols et photosynthèse .

IV - 5 - Quelques relations entre polyphénols et photosynthèse .

Compte-tenu des résultats de ce travail nous n'envisagerons que deux effets concernant l'absorption des polyphénols dans le proche ultraviolet et la photooxydation sensibilisée des ortho-diphénols .

IV - 5 - 1 - Absorption dans le proche ultraviolet .

Les pigments polyphénoliques absorbent principalement dans le proche ultraviolet (tableau 2) . Cependant leur absorption varie beaucoup en fonction du pH (figures 25 , 37 et 41) . Cette variation est de façon générale très importante dans la zone des pH " physiologiques " (figure 32) mais elle reste limitée au seul domaine ultraviolet du spectre .

Dans ce travail , en comparant l'absorption relative des pigments liposolubles à celle des polyphénols , nous avons montré que , de façon générale , les polyphénols sont les principaux pigments responsables de l'absorption du rayonnement solaire , reçu par les feuilles dans le proche ultraviolet entre 290 et 400 nm . Ce résultat permet d'expliquer la chute du rendement de la photosynthèse observée par Mc CREE (1973) dans l'ultraviolet . Il convient cependant de souligner que ces données sont insuffisantes pour décrire quantitativement ce phénomène . Elles ne permettent pas de tenir compte en effet , ni de l'état d'ionisation des différents polyphénols , ni de leur localisation dans les diverses parties de la cellule ou dans les différents tissus . Il serait intéressant de préciser ces points par microspectrophotométrie .

Ce premier exemple d'effet des polyphénols sur la photosynthèse est indirect ou physique . On peut opposer à cet effet les effets chimiques résultant de réactions directes des polyphénols avec des molécules actives dans la photosynthèse .

Dans l'introduction , nous avons tenté de résumer ces principaux types d'interaction . Nous envisagerons seulement ici le phénomène de photooxydation des ortho-diphénols par les préparations chloroplastiques et certaines de ses conséquences .

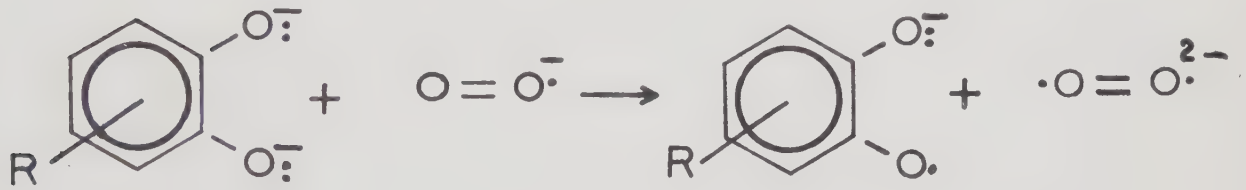
IV - 5 - 2 - Photooxydation sensibilisée des ortho-diphénols .

Nous avons observé , dans ce travail , que l'activité DPO de la phénolase est en général latente dans les préparations chloroplastiques , mais qu'elle augmente lors du " vieillissement des chloroplastes " (tableau 13) . De plus nous avons constaté systématiquement la présence de composés polyphénoliques de type monophénol ou ortho-diphénol dans ces mêmes préparations . Nous pouvons donc admettre que les ortho-diphénols contenus dans les préparations chloroplastiques ne sont pas en général oxydés par effet DPO de la phénolase mais plutôt par réaction de photooxydation sensibilisée par l'activité photosynthétique (TREBST , 1963) . Il est bien démontré que ce type de réaction , qui aboutit à la formation par exemple de la quinone de l'acide chlorogénique avec production de H_2O_2 (TREBST , 1963) , est une forme de la réaction de MEHLER . Or , récemment ASADA et KISO (1973) ont rapporté l'existence d'une photooxydation de l'adrénaline par les chloroplastes . Confirmant le caractère général de ce type de photooxydation , ces auteurs ont démontré , par inhibition au moyen de superoxyde-dismutase , que cette oxydation résulte de la formation d'ions superoxydes $O_2^{\cdot -}$ par les chloroplastes à la lumière .

Or la photooxydation de l'acide ascorbique par les chloroplastes a été attribuée aussi à la formation de $O_2^{\cdot -}$ (ALLEN et HALL , 1973 - ELSTNER et KRAMER , 1974) . Il semble donc justifié de supposer que l' l'anion radicalaire $O_2^{\cdot -}$, formé par la réduction monovalente de la molécule d'oxygène , peut , compte-tenu de sa grande réactivité , réagir avec les polyphénols présents dans les préparations chloroplastiques . Une telle hypothèse est rendu d'autant plus vraisemblable que le potentiel d'oxydo-réduction de l'adrénaline est pratiquement égal à celui de la DOPA (tableau 3) qui est lui-même voisin de celui des dérivés de l'acide caféique . Compte-tenu de ces valeurs , il paraît possible d'expliquer la photooxydation sensibilisée des ortho-diphénols par les chloroplastes par la formation d'ortho-semiquinone selon la réaction :

O - diphénol + ion superoxyde → O - semiquinone + ion peroxyde

que l'on peut formuler , en explicitant les transferts d'électrons par :



Une réaction analogue a été proposée pour expliquer l'oxydation du Tiron (acide 1,2-dihydroxybenzène-3,5-disulfonique) en présence d'ion superoxyde formé par voie enzymatique aussi bien que photochimique (MILLER et RAPP , 1973) .

La formation d'ions superoxydes peut résulter de la réduction monovalente de la molécule d'oxygène par des semiquinones de potentiel suffisamment faible (BENSASSON et LAND , 1973) . Dans les préparations chloroplastiques , l'un des sites de formation des ions superoxydes pourrait être la ferrédoxine-NADP-réductase (IUB = 1-6-99-4) puisque cette enzyme catalyse in vitro la formation de tels ions (MASSEY et al. 1969 - NAKAMURA , 1970) ou bien l'accepteur primaire du photosystème I auquel seraient associées les polyphénols à activité FRS ou CRS (OETTMEIER et LOCKAU , 1973) .

Les ions-radicalaires ainsi formés pourraient être piégés par les plastoquinones , dont le potentiel d'oxydo-réduction est suffisamment élevé (BENSASSON et LAND , 1973) pour qu'il y ait , à nouveau dégagement

d'oxygène avec formation des parasemiquinones correspondantes . Au contraire , ces mêmes ions réagissant avec les ortho-diphénols formeraient des ortho-semiquinones susceptibles de se dismuter avec formation de quinone . Cette dernière réaction expliquerait donc l'existence de réactions de photooxydation des ortho-diphénols ; on aurait :

2 (ortho-semiquinone) ⟶ ortho-diphénol + ortho-quinone

Nous avons résumé l'ensemble de ces réactions sur la figure 51 .

Compte-tenu du fait que les ortho-quinones sont réduites très aisément, par voie enzymatique ou non enzymatique en présence de NAD(P) réduit (WOSILAIT et al. 1954 - IYANAGI et YAMAZAKI , 1970) , un tel processus aurait pour effet de catalyser la destruction des ions superoxydes au prix , il est vrai , d'une consommation des composés réduits produits par l'activité photosynthétique . Nous envisagerons ici seulement deux conséquences possibles de cette séquence de réactions .

Premièrement on peut supposer que la présence systématique de polyphénols dans les préparations chloroplastiques permet une production de H_2O_2 et une destruction de composés réduits NAD(P) réduit par exemple . L'importance de ces réactions tant in vitro (que peut être aussi in vivo , si l'on admet la présence de polyphénols dans les chloroplastes) mériterait d'être précisée . Il convient d'ajouter à cela que l'activité MnO de la phénolase chloroplastique pourrait favoriser ce type de réaction en catalysant la biosynthèse in vitro , et peut être aussi in vivo , d'ortho-diphénols .

Deuxièmement , il est possible aussi que la réaction non enzymatique de réduction des quinones par les composés réduits produits par la photosynthèse , intervienne dans la protection contre les lésions que l'on attribue de façon générale in vivo aux réactions de l'ion $O_2^{\cdot -}$ (LAVELLE et al. 1973) . Il convient de souligner que la superoxyde-dismutase présente dans les chloroplastes (ASADA et al. 1973 - ALLEN et HALL , 1973) constitue probablement un système de protection directe , au moins aussi efficace , contre ces lésions . Cependant , il est nécessaire d'ajouter que l'on ne peut pas exclure une synergie entre ces deux systèmes de protection (RAFF et al. 1973) , puisque en particulier les ortho-diphénols peuvent chélater , entre autre , le cuivre présent dans le site actif de la superoxyde-dismutase et , que des interactions analogues sont possibles aussi , avec les monophénols .

En résumé , les polyphénols paraissent susceptibles d'affecter les activités photosynthétiques premièrement au niveau de l'accepteur terminal du photosystème I , hypothèse encore très fragile , secondement en tant qu'effecteur allostérique d'enzymes , hypothèse plus vraisemblable et enfin troisièmement , en tant que piège radicalaire en particulier de l'ion $O_2^{\cdot -}$. Il convient de remarquer que les ions $O_2^{\cdot -}$ se forment aisément

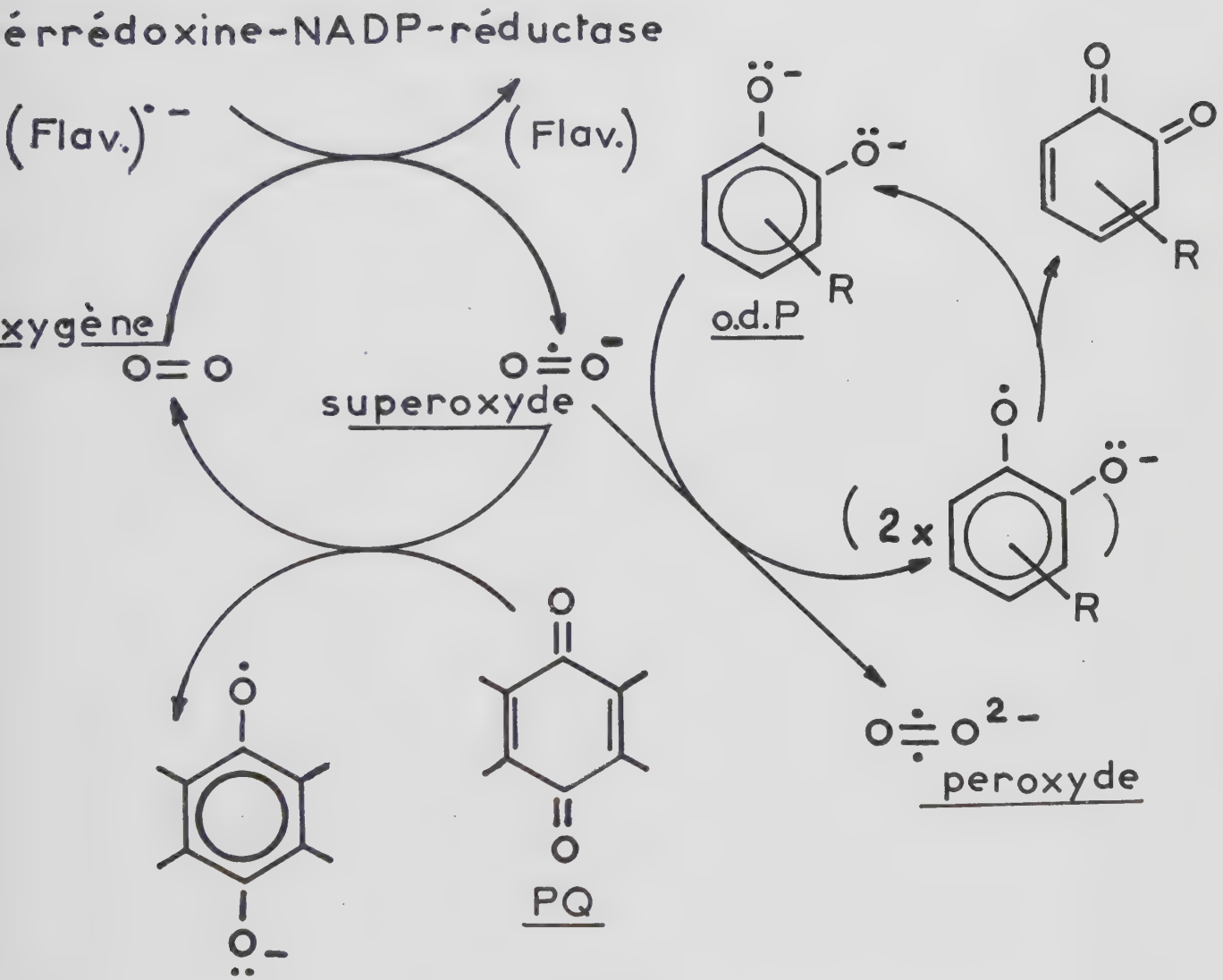


Figure 51 - REACTION DE PHOTOOXYDATION SENSIBILISEE DES ORTHO-DIPHENOLS .

La réduction de la molécule d'oxygène à l'état d'ion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ peut avoir lieu au niveau de flavoprotéines (Flav.) et de la ferredoxine NADP réductase réduite , l'ion radicalaire $O_2^{\bullet -}$ est ensuite piégé soit par les plasto-quinones (PQ) ou par les ortho-diphénols (o.d.P) différemment substitués (R) .

in vivo par voie photochimique et particulièrement sous éclairement ultraviolet . En conséquence les polyphénols sont susceptibles d'exercer une double protection contre le rayonnement ultraviolet , d'une part physique par effet d'écran , d'autre part chimique par effet de piège radicalaire .

C'est donc cette dernière hypothèse de double protection contre le rayonnement ultraviolet , qui nous semble actuellement la plus vraisemblable . En effet , une telle hypothèse ne présuppose rien sur la structure de détail des polyphénols mais seulement l'existence de propriétés spectroscopiques (tableau 2) et oxydoréductrices (tableau 3) qui sont étroitement dépendantes . Il est donc possible que , au cours de l'évolution ,soient apparus dans les végétaux , des polyphénols très différents dans leur détail mais très voisins par leur type et donc leurs propriétés . Une telle diversité dans les moyens est tout à fait générale dans les systèmes thermodynamiquement ouverts (BARTALANFY , 1973) qui sont susceptibles de réaliser le même état stationnaire par des voies différentes .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AKULOVA E.A , MIRONOVA G.D. , MUKIN E.N. , RUZIEVA R.K. , MURZAEVA S.V , SALNIKOVA S.P. , 1972. -[Flavonoïdes et énergétique des chloroplastes et mitochondries isolés]. Dokl. Akad. Nauk SSSR - 206 , 988-991 .

ALIBERT G. , RANJEVA R. , BOUDET A. , 1972. - Recherches sur les enzymes catalysant la biosynthèse des acides phénoliques chez Quercus pedonculata : III . Physiol. Plant.- 27 , 240-243 .

ALLEN J.F. , HALL D.O. , 1973. - Superoxyde reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen uptake by isolated chloroplasts . Bioch. Bioph. Res. Comm. 52 , 856-862 .

ALSTON R.E. , 1964. - The genetics of phenolic compounds in " Biochem. Phenolic Compounds " 171-204 - Editeur : HARBORNE J.B , pub. Acad. press 618 p.

ALSTON R.E , 1968. - C-glycosylflavonoids . Rec. Adv. Phytochem. 1 , 305-327 .

AMESZ J. , 1973. - The function of plastoquinone in photosynthetic electron transport . Bioch. Bioph. Acta - 301 , 35-51 .

ANDERSON J.A. , 1933. - The yellow coloring matter of Khapli wheat Triticum dicoccum - III - Constitution of Tricin . Canad. J. Research - 9 , 80-83 .

ANDERSON J.W. , 1968. - Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues . Phytochem. 7 , 1973-1988 .

ARNAUD Y. , 1968. - Etude par ultracentrifugation analytique d'un système enzymatique monomère-polymère (polyphénol-oxydase) . J. Polym. Science - 16 C , 4103-4111 .

ARNON D.I. , 1949. - Copper enzymes in isolated chloroplasts : phenoloxydase in Beta vulgaris . Plant Physiol. 24 , 1-15 .

ARNON D.I. , ALLEN M.B. , WHATLEY R.F. , 1956. - Photosynthesis by isolated chloroplasts - IV - General concept and comparison of three photochemical reaction . Bioch. Bioph. Acta - 20 , 449-461 .

ARNTZEN C.J. , FALKENTHAL S.V. , BOBICK S. , 1974. - Inhibition of photophosphorylation by kaempferol . Plant Physiol. 53 , 304-306 .

ASADA K., KISO K. , 1973. - The photooxydation of epinephrine by spinach chloroplasts and its inhibition by superoxyde dismutase : evidence for the formation of superoxyde radicals in chloroplasts . Agric. Biol. Chem. 37 (2) , 453-454 .

ASADA K. , URANO M. , TAKAHASHI M. , 1973. - Subcellular localisation of superoxyde dismutase in spinach leaves and preparation and properties of cristalline superoxyde dismutase . Eur. J. Biochem. 36 , 257-266 .

ASEN S. , EMSWELLER S.L. , 1962. - Hydroxycinnamic acids and their glucose esters in hybrids of Lilium species and their relation to germination . Phytochem. 1 , 169-174 .

BALNY C. , DOUZOU P. , 1974. - Production of superoxyde ions by photosensitization of dyes . Bioch. Bioph. Res. Comm. 56 , 386-391 .

BARTALANFFY L. von , 1973. - Théorie générale des systèmes . Traduit par CHABROL J.B. - 296 p. - Dunod Edit.

BARTLETT D.J. , POULTON J.E. , BUTT V.S. , 1972. - Hydroxylation of p-coumaric acid by illuminated chloroplasts from spinach beet leaves . FEBS Letters - 23 , 205-267 .

BATE-SMITH E.C. , 1948. - Paper chromatography of anthocyanins and related substances in petals extracts . Nature - 161 , 835-838 .

BATE-SMITH E.C , 1956. - The commoner phenolic constituents of plants and their systematic distribution . Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. 27 , 155-176 .

BATE-SMITH E.C. , 1962. - The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance . J. Linn. Soc. (Bot.) 50 , 95-173 .

BATE-SMITH E.C. , 1963. - Paper chromatography of phenolics . In Methods in polyphenol chemistry . 75-79 . Edit. PRIBRAM J.B. - Pub. Pergamon Press - 146 p.

BAYSE G.S. , MORRISON M. , 1971. - The role of peroxidase in catalysing oxidation of polyphenols . Bioch. Bioph. Acta - 244 , 77-84 .

BEARDEN A.J. , MALKIN R. , 1972. - The bound ferredoxin of chloroplasts : a role as primary acceptor of photosystem I . Bioch. Bioph. Res. Comm. 46 , 1299-1305 .

BENSASSON R , LAND E.J. , 1973. - Optical and kinetic properties of semi-reduced plastoquinone and ubiquinone : electron acceptors in photosynthesis . Bioch. Bioph. Acta - 325 , 175-181 .

BERKALOFF C. , DEROCHE M.E. , 1971. - Pertes chlorophylliennes subies par les chloroplastes frais ou lyophilisés de feuilles de Blé au cours des diverses étapes préparatoires à l'observation en microscopie électronique . C.R. Acad. Sci. 273 , 1367-1370 .

BIRCH A.J. , 1967. - Biosynthesis of polyketides and related compounds . Science - 156 , 202-206 .

BIRKOFFER L. , KAISER C. , KOSMOL H. , 1960. - Zuckerester von hydroxy-zimtsäuren in Petunia hybrida . Naturwiss. 20 , 469-470 .

BLACK C.C. , TORNER J.F. , GIBBS M. , KROGMANN D.W. , GORDON S.A. , 1962. - Studies on photosynthetic process . Part. II . J. Biol. Chem. 237 , 580-583 .

BOKUTCHAVA M.A. , TCHALATVERIDZE T.R. , SOLOLEVA G.A. , 1970. -[Localisation de la phénolase dans les feuilles du Theier]. Dokl. Akad. Nauk SSSR - 192 , 1374-1375 .

BOUILLANT M.L. , FAVRE-BONVIN J. , CHOPIN J. , 1974. - Spectrométrie de masse des perméthyl C-glycosylflavones - Communication à la IIIe Assemblée Générale du Groupe Polyphénols - Lyon - Mai 1974 . (A paraître) dans "Bulletin de Liaison du Groupe Polyphénols", n° IV .

BROWN G.B. , DEAKIN J.R. , WOOD M.B. , 1969. - Identification of Cucumis species by paper chromatography of flavonoids . J. Amer. Soc. Hort. Sci. 94 , 231-234 .

BÜCHE E. , SANDERMANN M. , 1973. - Lipid dependance of plant microsomal cinnamic acid - 4 - hydroxylase . Arch. Bioch. Bioph. 185 , 145-147 .

BUTT V.S. , VAUGHAN P.F.T. , 1972. - Role of phenolases in the synthesis of plant phenolics . Phytochem. 11 , 861-862 .

CAMM E.E. , 1972. - Phenolic metabolism in plants : intracellular localisation of some enzymes . Ph. D. University Britisch Columbia - 91 p. - Public Arch. Canada Microfilm.

CAMM E.L. , TOWERS G.H.N. , 1973 a. -Phenylalanine ammonialyase . Phytochem. 12 , 961-973 .

CAMM E.L. , TOWERS G.H.N. , 1973 b. - Phenylalanine ammonialyase in sliced sweet potatoes roots . J. Biochem. 57 , 678-688 .

CHARRIERE-LADREIX Y. , 1973. - Etude de la secrétion flavonoidique des bourgeons de populus nigra var. Italica , cinétique du phénomène secrétoire ultrastructure et évolution du tissu glandulaire . J. Microscopie - 17 , 299-311 .

CHEVREUL , 1832. - Rapport société philomatique . J. Chim. Med. Pharm. Tox. 6 , 157-159 .

CARLIN R.M. , McCLURE J.W. , 1973. - Action spectra for C-glucosylflavone accumulation in Hordeum vulgare plumule . Phytochem. 12 , 1009-1015 .

CHADEFAUD M. , EMBERGER L. , 1960. - Traité de Botanique systématique . Tome II - p. 24 - Edit. Masson .

CHOPIN J. , 1966. - Les C-glycosylflavonoïdes - In Actualités Phytochem. Fondamentale - 44-72 , Edit. MENTZER C. - Pub. MASSON - 320 p.

CODD G.A. , SCHMID G.H. , 1971. - On the acceptor specificity of glycollate oxydase of Nicotiana tabaccum . Planta - 99 , 230-239 .

COGGON P. , MOSS G.A. , SANDERSON G.W. , 1973. - Thea catechol oxidase : isolation , purification and kinetic caracterization . Phytochem. 12 , 1947-1955 .

COMBES R. , 1936. - La nutrition glucidique de la corolle . C.R. Acad. Sci. 203 , 1283-1284 .

COSTES C. , MILHET Y. , 1970. - Etude photophysiologique du Poivron . 45 p. - Edit. S.E.I. , n° 45 - Ministère de l'Agriculture - INRA .

COSTES C. , BAZIER R. , 1971. - Heterogeneity and structural role of lipids in chloroplasts membranes . Proc. IId Int. Congr. Photosynthesis (Stresa) - 1635-1645 - Edit. FORTI G.

COSTES C. , BAZIER R. , LECHEVALLIER D. , 1972. - Rôle structural des lipides dans les membranes des chloroplastes de Blé . Physiol. Vég. 10 , 291-317 .

COUPE M. , PUJARNISCLE S. , AUZAC J. de , 1972. - Compartimentation des diverses oxydoréductases (peroxydase , O-diphénol-oxydase et malate déshydrogénase) dans le latex d'Hevea brasiliensis K. Physiol. Vég. 10 , 459-480 .

CZANINSKI Y. , CATESSON A.M. , 1972. - Localisation ultrastructurale d'activités polyphénoloxydasiques dans les chloroplastes de Nicotiana glutinosa . J. Microscopie - 15 , 409-414 , 3 pl.

DACRE J.C. , 1971. - Nonspecificity of the Gibbs reaction . Anal. Chem. 43 , 589-591 .

DE JONG D.W. , 1973. - Modification of tabacco leaf glycolate oxydase activity by chlorogenic acid and other polyphenols . Plant Physiol. 29 , 150-156 .

DELAVEAU P. , 1967. - Les polyphénols , en particulier les flavonoïdes de la grande capucine . Thèse Doc. Sci. Nat. 116 p.

DELAVEAU P. , 1968. - Essai de localisation histochimique des flavonoïdes par observation en lumière ultraviolette . C.R. Acad. Sci. 267 726-728 .

DELAVEAU P. , PARIS R.R. , 1969. - Répartition anatomique et histologique des flavonoïdes chez Ruscus racemosus L. C.R. Acad. Sci. 269 , 1074-1076 .

DELAVEAU P. , PARIS R.R. , 1972. - Répartition , localisation et transport des polyphénols chez les végétaux . J. Pharm. Belg. 27 , 57-70 (et références citées) .

DEROCHE M.E. , 1969. - Hétérogénéité des pigments liposolubles des chloroplastes de Blé . Physiol. Vég. 7 , 335-389 .

DEROCHE M.E. , COSTES C. , 1966 a. - Hétérogénéité des chlorophylles . Ann. Physiol. Vég. 8 , 223-254 .

DEROCHE M.E. , COSTES C. , 1966 b. - Hétérogénéité du β-carotène dans les chloroplastes . Ann. Physiol. Vég. 8 , 259-269 .

DIETRICHS M.H. , SCHAICH E. , 1963. - Flavonolglucoside in Knospen und Blättern der Rotbuche (Fagus sylvatica L.) Naturwiss. 50 , 478 .

DUFRAISSE C. , 1936. - Catalyse d'autoxydation : antioxygènes et prooxygènes . Dans Traité de Chimie Organique - 2 (2) , 1147-1196 - Edit. GRIGNARD , Pub. MASSON .

DOWNS R.J. , SIEGELMAN H.W. , BUTLER W.L. , HENDRICKS S.B. , 1965. - Photoreceptive pigments for anthocyanin synthesis in apple skin . Nature - 205 , 909-910 .

EL-BASYOUNI S. , TOWERS G.H.N. , 1964. - The phenolic acids in wheat . I - changes during growth and development . Can. J. Biochem. 42 , 203-210 .

ELSTNER E.F. , KRAMER R. , 1973. - Role of the superoxyde free radical ion in photosynthetic ascorbate oxydation and ascorbate mediated photophosphorylation . Bioch. Bioph. Acta - 314 , 340-353 .

ENGASSER J.M. , HORVATH C. , 1973. - Effect of internal diffusion in heterogeneous enzyme systems : evaluation of true kinetic parameters and substrate diffusivity . J. Theor. Biol. 42 , 137-155 .

EREZ A. , 1973. - Possible error in quantitative determination of phenylalanine-ammonialyase by spectroscopic methods . Plant Physiol. 51 , 409-411 .

FAIRBAIRN J.W. , SIMIC S. , 1963. - The quantitative conversion of barboloin to aloe-emodin and its application to the evaluation of aloes . J. Pharm. Pharmacol. 15 , 325-328 .

FEITELSON J. , HAYON E. , 1973. - Electron ejection and electron capture by phenolic compounds . J. Phys. Chem. 77 , 10-15 .

FIRENZUOLI A.M. , VANNI P. , MASTRONUZZI E. , 1969. - The effect of some aromatic compounds on pure enzymes and their subsequent reactivation by PVP and TWEEN 80 . Phytochem. 8 , 61-64 .

FUJITA Y. , MYERS J. , 1971. - Cytochrome reducing substance in "Methods in Enzymology" - 23 A , 613-618 - Edit. A. SAN-PIETRO - Pub. Acad. Press - 743 p.

FURAYA M. , GALSTON A.W. , 1965. - Flavonoid complexes in pisum sativum : I Phytochem. 4 , 285-296 .

GEE R. , KYLIN A. , SALTMAN P. , 1970. - Enhancement of photophosphorylation and photoreduction by a chloroplast factor from Spinach leaves . Bioch. Bioph. Res. Comm. 40 , 642-648 .

GEISSMAN T.A. , 1955. - Anthocyanins , chalcones , aurones , flavones and related water-soluble pigments in " Moderne Methoden der Pflanzenanalyse " - Vol. III - 450-498 - Edit. PAECH K. , TRACEY M.V. - Pub. SPRINGER - 761 p.

GEISSMAN T.A. , 1958. - The metabolism of phenylpropane derivatives in plants in " Handbuch Pflanzenphysiol" - Vol. 10 - 543-595 - Edit. RUHLAND W. - Pub. SPRINGER - 834 p.

GERHARDT B. , 1964; - Untersuchungen über Beziehungen zwischen Ascorbiusäure und photosynthese . Planta - 61 , 101-129 .

GIBBS H.D. , 1927. - Phenol test III the indophenol test . J. Biol. Chem. 72 , 649-664 .

GLOSSMANN H. , NEVILLE D.M. Jr , 1973. - Phloridzin receptors in isolated kidney brush border membranes . Bioch. Bioph. Acta - 323 , 408-414 .

GOLDSTEIN J. , SWAIN T. , 1965. - The inhibition of enzymes by tannins . Phytochem. 4 , 185-192 .

GOOD N. , IZAWA S. , HIND G. , 1966. - Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylation in " Current Topics in Bioenergetics " 1 , 75-112 - Edit. SANADI - Pub. Acad. Press .

GORIS A. , 1914. - Localisation et rôle des alcaloïdes et des glycosides chez les végétaux . 2ieme Edit. - 448 p. - Edit. LECHEVALIER .

GRAMBOW H.J. , GRISEBACH H. , 1971. - Further studies on the biosynthesis of flavonoides in Datisca cannabina . Phytochem. 10 , 789-796 .

GRIPENBERG J. , 1962. - Flavone - In the Chemistry of Flavonoid compounds - 406-440 - Edit. GEISSMAN T.A. - Pub. Perg. Press - 666 p.

GRISEBACH H. , 1965. - Biosynthesis of flavonoids - In Biochem. of Plant pigments - 279-308 - Edit. T.W. GOODWIN - Pub. Acad. Press. - 563 p.

GRISEBACH H. , 1968. - Recent investigation on the biosynthesis of flavonoids . Rec. Adv. Phytochem. 1 , 379-406 .

GUILLIERMOND A. , 1913. - Sur la formation de l'anthocyane au sein des mitochondries . C.R. Acad. Sci. 156 , 1924-1926 .

GUILLIERMOND A. , GAUTHERET R. , 1933. - Caractères microchimiques des composés oxyflavoniques , leur localisation dans les vacuoles . C.R. Acad. Sci. 196 , 369-371 .

HALLDAL P. , 1967. - Ultraviolet action spectra in algology . Photochem. Photobiol. 6 , 445-460 .

HAMILTON G.A. , 1969. - Mechanism of two and four electron oxidations catalysed by some metalloenzymes . Adv. Enzymol. 32 , 56-95 .

HARBORNE J.B. , 1964. - Préface de " Biochemistry of phenolic compounds " . Edit. HARBORNE J.B. - Pub. Acad. Press - 618 p.

HARBORNE J.B. , 1965. - Plant polyphenols - XIV . Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzyme hydrolysis . Phytochem. 4 , 107-120 .

HARBORNE J.B. , 1966. - The evolution of flavonoid pigments in plants in " Comparative Phytochemistry " 271-295 - Edit. SWAIN T. - Pub. Acad. Press - 360 p.

HARBORNE J.B. , 1972. - Evolution and function of flavonoids in plants . Rec. Adv. Phytochem. 4 , 107-141 .

HARBORNE J.B. , HALL E. , 1964. - Plant polyphenols - XII . The occurence of tricin and of glycoflavones in grasses . Phytochem. 3 , 421-428 .

HAREL E. , MAYER A.M. , LEHMAN E. , 1973. - Multiple forms of Vitis vinifera catechol oxydase . Phytochem. 12 , 2649-2654 . (ainsi que leurs autres articles cités en référence) .

HAREL E. , MAYER A.M. , SHAIN Y. , 1965. - Purification and multiplicity of catechol oxydase from apple chloroplasts . Phytochem. 4 , 783-790 .

HARPER D.B. , AUSTIN D.J. , SMITH H. , 1970. - The photocontrol of precursors incorporation into the pisum sativum flavonoids . Phytochem. 9 , 497-505 .

HATTORI S. , SATO M. , 1963. - The oxydation of arbutin by isolated chloroplasts of arbutin containing plants . Phytochem. 2 , 385-395 .

HEBER U. , 1960. - Vergleichende Untersuchungen an Chloroplasten die durch Isolierungs Operationen in nicht wässerigen und in wässerigen Milieu erhalten wurden - II - Krititk der Reinheit und Ferment Lokalisationen in Chloroplasten . Z. Naturforchg. 15 B , 100-109 .

HESS D. , ENDRESS R. , 1973. - Anthocyansynthese in isolierten Protoplasten von Nemesia strumosa , var. Feuerkönig . Z. Pflanzenphysiol. 68 , 441-449 .

HÖRHAMMER L. , STICH L. , WAGNER H. , 1961. - Uber die Flavoglykoside der Lindenblüten I . Arch. Pharm. 294 , 685-692 .

HORNER L. , GEYER E. , 1965. - Redoxpotentiale von Brenzcatechin derivaten . Chem. Ber. 98 , 2016-2045 .

HOROWITZ R.M. , GENTILI B. , 1966. - Long range proton shielding in C-glycosyl-compounds : structure of some new C-glycosylflavones . Chem. Ind. 625-627 .

HÖSEL W. , BARZ W. , 1972. - Enzymatic transformation of flavonols with a cell-free preparation from Cicer arietinum L. Bioch. Bioph. Acta - 261 , 294-303 .

HÖSEL W. , FREY G. , TEUFEL E. , BARZ W. , 1972. - Uber das Vorkommen und Lokalisation eines flavonolumwandelnden Enzyms in Pflanzen . Planta - 103 , 74-86 .

HOSOI K. , YOSHIDA S. , 1969. - Activity of ammonia-lyases for aromatic amino-acids in barley seedlings . Bot. Mag. (Tokyo) 82 , 239-243 .

HULME A.C. , JONES J.D. , WOOLTORTON L.S.C. , 1964. - Mitochondrial preparation from the fruit of apple I . Phytochem. 3 , 173-188 .

IYANAGI T. , YAMAZAKI I. , 1970. - One electron transfer in biochemical systems - V - Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD (P) H dehydrogenase (DT-diaphorase) . Bioch. Bioph. Acta - 216 , 282-294 .

IZAWA S. , WINGLET G. , GOOD N.E. , 1966. - Phlorizin , a specific inhibitor of photophosphorylation and phosphorylation coupled electron transport in chloroplasts . Bioch. Bioph. Res. Comm. 22 , 223-226 . Voir aussi des mêmes auteurs " Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylations " in 1966 ."Current topics in Bioenergetics". I - 75 , 1112 - Edit. SANADI - Pub. Acad. Press .

JOHNSTON K.M. , STERN D.J. , WAISS A.C.Jr , 1968. - Separation of flavonoid compounds on Sephadex LH-20 . J. Chromatog. 33 , 539-541 .

JONG D.W. DE , 1973. - Modification of tobacco leaf glycolate oxidase activity by chlorogenic acid and other polyphenols . Physiol. Plant - 29 , 150-156 .

JULIAN E.A. , JOHNSON G. , JOHNSON D.K. , DONNELLY B.J. , 1971. - The glyco-flavonoid pigments of wheat Triticum aestivum leaves . Phytochem. 10 , 3185-3193 .

JURD L. , 1956. - A spectroscopic method for the detection of O-dihydroxy-groups in flavonoid compounds . Arch. Bioch. Bioph. 63 , 376-381

JURD L. , 1962. - Spectral properties of flavonoid compounds . In " The chemistry of flavonoid compounds " , 108-155 - Edit. GEISSMAN T.A. - Pub. Pergamon Press - 666 p.

JURD L. , GEISSMAN T.A. , SEIKEL M.K. , 1957. - The flavonoid constituents of Spirodella oligorhisa - II - The flavone constituents . Arch. Bioch. Bioph. 67 , 284-297 .

KAHN G. , 1966. - Uber das gleichgewicht zwischen den stereoisomeren einiger Zimtsäurederivate in Abhangigkeit von der molaren Konzentration und ihre Quantitativen Spektrophotometrische Messung bei Pflanzenanalysen . Biolog. Zentralblatt. 85 , 545-554 .

KANNANGARA C.G. , HENNINGSEN K.W. , STUMPF P.K. , WETTSTEIN D. von , 1971. - 6-methylsalicylic acid synthesis by isolated barley chloroplasts . Eur. J. Biochem. 21 , 334-338 .

KARUSH F. , 1950. - Heterogeneity of the binding sites of bovine serum albumin . J. Am. Chem. Soc. 72 , 2705-2713 .

KE B. , HANSEN R.E. , BEINERT H. , 1973. - Oxidation-reduction potential of bound iron-sulfur proteins of photosystem I . Proc. Nat.Acad. Sci. 70 , 2941-2945 .

KEFELI V.I. , TURETSKAYA R.K. , 1966. -[Localisation d'inhibiteurs phénoliques naturels dans les cellules de feuilles de Saule] . Dokl. Akad. Nauk SSSR - 170 , 472-475 .

KERTESZ D. , ROTILIO G. , BRUNORI M. , ZITO R. , ANTONINI E. , 1972. - Kinetics of reconstitution of polyphenol-oxydase from apoenzyme and copper . Bioch. Bioph. Res. Comm. 49 , 1208-1215 .

KINDL H. , 1971a. - Zur frage der ortho-hydroxylierung aromatischer Carbonsaüren in höheren Pflanzen . Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 , 78-84 .

KINDL H. , 1971b. - Die Bildung eines Stilbens in isolierten Chloroplasten . Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 , 767-768 .

KINDL H. , 1971 c. - Aromatische Aminosauren in Stoffwechsel höherer Pflanzen . Naturwiss. 58 , 554-563 .

KINDL H. , RUIZ H. , 1971 a. - Subcellular distribution of p-hydroxybenzoic acid formation in castor bean endosperm . Z. Naturforschg. 26 B , 1379-1380 .

KINDL H. , RUIZ H. , 1971 b. - Metabolism of aromatic amino acids in glyoxysomes . Phytochem. 10 , 2633-2636 .

KIRBY L.T. , STYLES E.D. , 1970. - Flavonoids associated with specific gene action in maize aleurone and the role of light in substituting for the action of a gene . Can. J. Genet. Cytol. 12 , 934-940 .

KLEIN-EUDE D. , 1973. - Effet de quelques antibiotiques sur le développement de l'activité phénylalanine-ammonialyase des cotylédons de Radis . Thèse Doct. Spécialité - Faculté des Sciences de Rouen - 71 p.

KNIGHTS B.A. , 1971. - Sterols in chloroplasts : a description of two qualitatively distinct forms . Lipids - 6 , 215-218 .

KOUKOL J. , CONN E.E. , 1961. - The metabolism of aromatic compounds in higher plants - IV - Purification and properties of the phenylalanine-deaminase of Hordeum vulgare . J. Biol. Chem. 236 , 2692-2698 .

KRAMER Sr.E. , ROUTH J.I. , 1973. - The binding of salicylic acid and acetylsalicylic acid to human serum albumin . Clin. Biochem. 6 , 98-105 .

KROGMAN D.W. , STILLER M.L. , 1962. - A naturally occuring cofactor for photosynthetic phosphorylation . Bioch. Bioph. Res. Comm. 7 , 46-49 .

LANG D.R. , RACKER E. , 1974. - Effect of quercetin and F_1 inhibitor on mitochondrial ATPase and energy linked reactions in submitochondrial particles . Bioch. Bioph. Acta - 333 , 180-186 .

LAVELLE F. , MICHELSON A.M. , DIMITRIJEVIC L. , 1973. - Biological protection by superoxyde dismutase . Bioch. Bioph. Res. Comm. 55 , 350-357 .

LOFFELHARDT W. , LUDWIG B. , KINDL H. , 1973. - Thylakoïd-gebundene L-phenylalanin-ammoniak-lyase . Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 , 1006-1012 .

LOOMIS W.D , BATTAILE J. , 1966. - Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes . Phytochem. 5 , 423-438 .

LOTH H. , GRELBIG G. , KETZLER G. , KÖHNE H. , KRUSE B. , LANG B. , 1972. - Substituenteneinflüsse auf die Redoxpotentiale von Dihydroxyflavonderivaten . Arch. Pharm. 305 , 317-323 .

MABRY T.J. , MARKHAM K.R. , THOMAS M.B. , 1970. - The systematic identification of flavonoids . Edition SPRINGER (Berlin) - 354 p.

MAJAK W. , TOWERS G.H. , 1973 a. - Methods for the isolation and purification of ethanol-insoluble , phenolic esters in Mentha arvensis . Phytochem. 12 , 1141-1147 .

MAJAK W. , TOWERS G.H. , 1973 b. - Incorporation of $^{14}CO_2$, ^{14}C-phenylalanine and ^{14}C-cinnamate into soluble and insoluble cinnamic derivatives in Mentha arvensis . Phytochem. 12 , 2189-2195 .

MAKINO N. , MASON H.S. , 1973. - Reactivity of oxytyrosinase toward substrates . J. Biol. Chem. 248 , 5731-5735 .

MARAIS J.P. , 1967. - Separation of sugars on polyamid layers . J. Chromatog. 27 , 321-323 .

MARSH C.A. , 1955. - Quercetin glucosiduronic acid from the french bean . Nature - 176 , 176-177 .

MASON H.S. , 1955. - Comparative biochemistry of the phenolase complex . Adv. Enzymol. 16 , 105-184 .

MASON H.S. , KERTESZ D. , 1966. - Tyrosinase as an oxygen-transfering enzyme . 287-302 - In "Biological and Chemical Aspects of Oxygenases" - Edit. BLOCK K. , HAYASHI O. Pub.

MASSEY V. , STRICKLAND S. , MAYHEW S.G. , HOWELL L.G. , ENGEL P.C. , MATTHEWS R.G SCHUMAN M. , SULLIVAN P.A. , 1969. - The production of superoxyde anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen . Bioch. Bioph. Res. Comm. 36 , 891-897 .

MATHIEU J. , PANICO R. , 1972. - Mécanismes réactionnels en chimie organique . 575-581 - Edit. HERMANN - 764 p.

MAYER A.M. , 1964. - Factors controlling activity of phenolase in chloroplasts from sugar beets . Israel . J. Bot. 13 , 74-81 .

McCLURE J.W. , 1964. - Taxonomic significance of the flavonoid chemistry and the morphology of Lemnaceae in axenic culture - 250 p. - Ph. D 65 433 University Texas - University Microfilms Inc. Ann. Arbor USA .

McCLURE J.W. , 1968. - Photocontrol of Spinach intermedia flavonoids . Plant Physiol. 43 , 193-200 .

McCLURE J.W. , 1970. - Secondary constituents of aquatics angiosperms - 233-268 - In "Phytochemical Phylogeny" - Edit. HARBORNE J.B. - Pub. Acad. Press - 335 p.

McCLURE J.W. , WILSON K.G. , 1970. - Photocontrol of C-glycosylflavone in barley seedlings . Phytochem. 9 , 763-777 .

McCREE K.J. , 1971. - The action spectrum , absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants . Agric . Meteorol. 9 , 191-216 .

McCREE K.J. , 1972. - Test of current definition of photosynthetically active radiation against leaf photosynthesis data . Agric. Meteorol. 10 , 443-453 .

McCREE K.J. , DICKENSHEETS R.E. Jr , 1972. - The effect of epidermis absorption on leaf photosynthesis in the U.V. . Book of Abstracts - VIe Int. Cong. Photob. rep. 308 - Bochum

McCREE K.J. , 1973. - The effects of ultraviolet solar radiation on photosynthesis of agricultural crops . U.S.D.C. - Contract 1 - 35360 - Final Report - 42 p. et références citées .

McKINNEY G. , 1940. - Plant pigments . Ann. Rev. Biochem. 9 , 459-490 .

MERCK E. (A.G.) , 1965. - Révélateurs pour la chromatographie en couches minces sur papier - 80 p. - Pub. MERCK E. (A.G.) - Darmstadt .

MILLER R.W. , RAPP U. , 1973. - The oxydation of catechols by reduced flavins and dehydrogenases . J. Biol. Chem. 248 , 6084-6090 .

MINAMIKAWA T. , URITANI I. , 1965. - Phenylalanine ammonialyase in sliced sweet potato roots . J. Biochem. 57 , 678-688 .

MING-AU WU , BURREL R.C. , 1958. - Flavonoid pigments of the Tomato (Lycopersicum esculentum Mill.) . Arch. Bioch. Bioph. 74 , 114-118 .

MIRANDE M. , 1916. - Observations sur le vivant de la formation cytologique de l'anthocyanine . C.R. Acad. Sci. 163 , 368-371 .

MIRIMANOFF M.A. , 1938. - Contribution à l'étude des pigments oxyflavoniques . Rev. Cytol. Cytophys. Vég. 4 , 115-118 .

MONEY T. , 1970. - Biogenetic type synthesis of phenolic compounds . Chem. Rev. 70 , 553-560 .

MONTIES B. , 1966 a. - Nature et propriétés chimiques des principaux polyphénols de la pomme - I - . Ann. Physiol. Vég. 8 , 49-73 .

MONTIES B. , 1966 b. - Nature et propriétés chimiques des principaux polyphénols de la pomme - II - Ann. Physiol. Vég. 8 , 101-135 .

MONTIES B. , 1967. - Potentiel d'oxydoréduction des polyphénols , caractérisation potentiométrique des constituants phénoliques du jus de pomme et des boissons . Ann. Tech. Agric. 16 , 251-268 .

MONTIES B. , 1968. - Propriétés chimiques des chlorophylles : réaction de la chlorophylle a avec $AlCl_3$ et les acides de LEWIS . C.R. Acad. Sci. 266 , 921-924 .

MONTIES B. , 1969a. - Présence de composés phénoliques dans les chloroplastes d'angiospermes . Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég. 15 , 29-45 .

MONTIES B. , 1969 b. - Propriétés spectroscopiques des polyphénols - I - Points isobestiques et pseudo-isobestiques , application à l'étude des complexes organométalliques par la méthode des variations continues . Ann. Physiol. Vég. 11 , 161-176 .

MONTIES B. , 1971. - Occurence of C-glycosylflavone in the leaves and the chloroplasts of Melon , Cucumis melo .Proc. IId Int. Congr. Photosynthesis - Vol. II , 1681-1686 . - Edit. FORTI G. - Pub. JUNCK (1972) - 3 Vol.

MONTIES B. , 1972 a. - Studies on the near ultraviolet (300-400 nm) : relative absorption of leaf pigments (chlorophylls , carotenoids and flavonoids) and effects of this spectral band on these pigments . Book of Abstracts VI - Int. Congr. Photobiol. - Rep. 177 - Bochum A.O.

MONTIES B. , 1972 b. - Composés phénoliques et leur métabolisme dans les chloroplastes . Comm. 1ère A.G. du Groupe Polyphénols (Narbonne - France) - 14 p. , 3 fig. - dans " Bull. Liaison Groupe Polyphénols " - 3 - 1972 .

MONTIES B. , 1972 c. - The C-glycosylflavones in Cucurbitaceae . Comm. IUPAC - Int. Symp. on " Chemistry in Evolution and Systematics " . Juin 1972 - Strasbourg - France .

MONTIES B. , 1973 a. - Dosage des acides cinnamiques par réflectométrie sur couche mince . Comm. 2ème A.G. du Groupe Polyphénols (Pont de la Morge - Suisse) - 11 p. - 5 fig. dans " Bull. Liaison Groupe Polyphénols " - 4 - 1973 .

MONTIES B. , 1973 b. - Régulation par retro-inhibition de la phénylalanine-ammonialyase par les acides cinnamiques cis et trans . C.R. Acad. Sci. 276 , 1767-1768 .

MONTIES B. , 1973 c. - Formation de complexes moléculaires entre la riboflavine et l'acide cinnamique et ses dérivés : cinnamate d'éthyle , acides p-coumarique , férulique , caféique et diméthoxycaféique . C.R. Acad. Sci. 277 , 1167-1169 .

MONTIES B. , 1974. - Sur la présence de phénylalanine-ammonialyase dans les chloroplastes , C.R. Acad. Sci. 278 , 1465-1467 .

MONTIES B. , 1974. - Rayonnement ultraviolet et photosynthèse - Dans " Mécanisme de la photosynthèse et production végétale - Edit. COSTES C. (sous presse).

MONTIES B. , COSTES C. , 1968. - Propriétés des caroténoïdes chloroplastiques : réactions de la violaxanthine et du chlorure d'aluminium . C.R. Acad. Sci. 266 , 481-484 .

MONTIES B. , DOUILLARD R. , 1969. - Propriétés spectroscopiques des polyphénols II - Propriétés spectroscopiques des flavonols et de leurs complexes avec le chlorure d'aluminium . Ann. Physiol. Vég. 11 , 187-210 .

MONTIES B. , MARINE-FONT A. , DOUILLARD R. , 1969. - Propriétés spectroscopiques des polyphénols - III - Les complexes entre l'aluminium et les polyphénols . Ann. Physiol. Vég. 11 , 313-339 .

MORGAN P.W. , HALL W.C. , 1963. - Indolacetic oxidizing enzyme and inhibitors from light-grown cotton . Plant Physiol. 38 , 365-380 .

NAHRSTEDT A. , DUMKOW K. , JANISTYN B. , POHL R. , 1974. - Quercetin - galaktosid - gallate in Euphorbiaceen . Tetrahedron letters - 7 , 559-562 .

NAKAMURA S. , 1970. - Initiation of sulfite oxydation by spinach ferredoxin - NADP - reductase and ferredoxin system : a model experiment on the superoxyde anion radical production by metalloflavo proteins . Bioch. Bioph. Res. Comm. 41 , 177-183 .

NEISH A.C. , 1961. - Formation of m- and p-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine . Phytochem. 1 , 1-24 .

NELSON J.M. , DAWSON C.R. , 1944. - Tyrosinase . Adv. Enzym. 4 , 99-152 .

NEU R. , 1956. - Ein neues Reagens zum Nachweis und zur Unterscheidung von Flavonen im Papierchromatogramm . Naturwiss. 43 , 82 .

NEU R. , 1958. - Der Nachweiss der hydroxyphenyl-benzo-γ-pyrone mit diarylborsaüren in Gegenwart von Electronendonatoren . Naturwiss. 45 , 311-312 .

NEWMANN J. , AVRON M. , 1967. - Oxidation of phloridzin by isolated chloroplasts . Plant Cell. Physiol. 8 , 241-247 .

NIIOVA V.P. , ZARUBINA M.A. , GOSEVA T.A. , NAUMOV G.P. , CHERNIKOV S.L. , KUZNETSOVA S.V. , 1973. - [Inhibiteurs protéiques de la tyrosinase (O-diphénol-oxydase) des tubercules de pomme de terre]. Dokl. Akad. Nauk SSSR , 21 , 1467-1470 .

NYBOM N. , 1967. - Key for marking the colour of fluorescence on chromatograms . J. Chromatog. 26 , 520-521 .

ODA Y. , OH-E S. , WATANABE T. , 1973. - Phenoloxidase in Spinach leaves : intracellular distribution and some properties of the enzyme purified from mitochondria fraction . Nippon Nogei Kagaku Kaishi 47 (5) 301-307 .

OETTMEIER W. , HEUPEL A. , 1972 a. - Identification of flavonoids and cinnamic acids derivatives from Spinach chloroplasts preparation . Z. Naturforschg. 27 B , 177-183 .

OETTMEIER W. , HEUPEL A. , 1972 b. - p-coumaroyl meso-tartaric acid from Spinach chloroplasts preparation . Z. Naturforschg. 27 B , 586-587 .

OETTMEIER W. , LOCKAU W. , 1973. - Cytochrome c reducing substances in photosynthetic electron transport . Z. Naturforschg. 28 C , 717-721 .

ONSLOW M.W. , ROBINSON M.E. , 1928. - Oxidizing enzymes - X - The relationship of oxygenase to tyrosinase . Biochem. J. 22 , 1327-1331 .

PARIS R.R. , 1960. - Chromatographie et électrophorèse des flavonoïdes . Pharm. Act. Helv. 36 , 176-180 .

PARIS R.R. , 1973. - Les C-flavonosides . Rapport IId Ass. Gén. Groupe Polyphénols . Bull. Groupe Polyphénols - 4 , 3-9 .

PARIS R.R. , DELAVEAU P.G. , LEIBA S. , 1966. - Sur la présence de C-hétérosides chez la Bryone (Bryonia dioca Jacq.) - Isolement d'un C-flavonoside identifié à l'alliaroside . C.R. Acad. Sci. 262 , 1372-1374 .

PARISH R.W. , 1972. - The intracellular location of phenol oxydase and peroxydase in stems of Spinach beet (Beta vulgaris L.) . Z. Pflanzenphysiol. 66 , 176-188 .

PASTUSKA G. , TRINKS H. , 1961. - Die Dünnschicht elektrophorese und ihre Anwendung zur Trennung von Phenolen und Phenolcarbonsaüren . Chemiker Ztg. 85 , 535-538 .

PAULET A. , LECHEVALLIER D. , BAZIER R. , COSTES C. , MONEGER R. , 1973. - Extraction progressive des stérols des chloroplastes lyophilisés de Blé par des solvants de polarité croissante . Physiol. Vég. 11 , 655-661 .

PAULET P. , LIORET C. , 1965. - La néoformation de bourgeons chez Nicotiana sensibilité aux composés phénoliques externes , insensi aux composés phénoliques internes . 341 - 349 . Coll. Int. Phytohormones et Organogénèse . LIEGE (1965) .

PRIDHAM J.B. , 1959. - Paper electrophoresis and paper chromatography of phenolic compounds . J. Chromatog. 2 , 605-611 .

PROKHORCHIK R.A. , VOLYNETS A.P. , STOLOVICH V.N. , 1972. - [Influence des flavonoïdes sur quelques réactions photochimiques des chloroplast de Lupin]. Dokl. Akad. Nauk Bielo. SSSR - 26 , 755-758 .

PRYCE R.J. , 1972. - Gallic acid as a natural inhibitor of flowering in Kalanchoe blossfeldiana . Phytochem. 11 , 1911-1918 ..

PSENAK M. , VIZAROVA G. , 1973. - Effect of simple phenolic glycosides on the elongation of Avena first internode . Experientia - 28 , 788 .

RANDERATH K. , 1971. - Chromatographie sur couche mince - p. 52 et 290 ; chromatographie à répétition - 2ème édition - Pub. Gauthier-Villars - 398 p.

RAPP U. , WYMAN C.A. , MILLER R.W. , 1972. - Purification of superoxyde dismutase and characterization of the reaction of the enzyme with catechols by electron spin resonance spectroscopy . Can. J. Biochem. 51 , 158-171 .

RATHMEL W.G. , BENDALL D.S. , 1972. - The peroxydase catalysed oxydation of a chalcone and its possible physiological significance . Biochem. J. 127 , 125-132 .

RAUEN H.M. , 1964. - Biochemische Taschenbuch . Vol. 1 - Edit. SPRINGER - 1060 p.

REGITZ G. , OETTMEIER W. , 1972. - On the isolation of the possible primary acceptor of photosystem I by immunochemical methods . Proc. IId Int. Congr. Photosynthesis Res. Vol. I , 499-506 . Edit. FORTI G. - Pub. JUNK .

RIBEREAU-GAYON P. , 1968. - Les composés phénoliques des végétaux . Pub. DUNOD - 254 p.

RISSLAND I. , MOHR M. , 1967. - Phytochrom induzierte Enzymbildung (Phenylalanine deaminase) ein schnell ablaufender Prozess . Planta - 77 239-249 .

SCOTT A.J. , 1964. - Interpretation of ultraviolet spectra of natural products . Pub. Perg. Press - 443 p.

SEGUIN A. , 1797. - Rapport au Comité de Salut public sur les nouveaux moyens de tanner les cuirs proposé par le citoyen A. SEGUIN . Ann. Chimie - 20 , 15-65 .

SEIKEL M.K. , 1964. - Identification of phenolic compounds . 32-76 - In " Biochemistry of phenolic compounds " - Edit. HARBORNE J. - Pub. Acad. Press - 618 p.

SEIKEL M.K. , GEISSMAN T.A. , 1957. - The flavonoid constituents of barley (Hordeum vulgare) - I - Saponarin . Arch. Bioch. Bioph. 71 , 17-30 .

SEIKEL M.K. , BUSHNELL A.J. , 1959. - The flavonoid constituents of barley (Hordeum vulgare) - II - Lutonarin . J. Org. Chem. 24 , 1995-1997 .

SESHADRI T.R. , 1951. - Biochemistry of natural pigments (exclusive of haeme pigments and carotenoids . Ann. Rev. Biochem. 20 , 487-511 .

SHEEN S.J. , 1973. - Changes in amounts of polyphenols and activity of related enzymes during growth of Tobacco flower and capsule . Plant Physiol. 51 , 839-844 .

SHIMOKORIYAMA , 1962. - Flavanones , chalcones , aurones in " The chemistry of flavonoid compounds " - 286-316 - Edit. GEISSMAN T.A. - Pub. Perg. Press - 666 p.

SIEGENTHALER P.A. , VAUCHER-BONJOUR P. , 1971. - Vieillissement de l'appareil photosynthétique - III - Variations et caractéristiques de l'activité O-diphényloxydase au cours du vieillissement in vitro de chloroplastes isolés d'Epinard . Planta - 100 , 106-123 .

SMITH I. , 1960. - Chromatographic and electrophoretic techniques - Vol. I - p. 290-354 - Edit. W. HEINEMANN - MEDICAL BOOK (Londres) - 617 p.

SMITH H. , 1973. - Regulatory mechanism in photocontrol of flavonoid biosynthesis in " Biosynthesis and its control in plants " - 303-321 - MILBORROW B.V. edit. - Pub. Acad. Press - 364 p.

SMITH E.L. , PAGE J.E. , 1948. - The acid binding properties of long chain aliphatic amines . J. Sci. Chem. Ind. 67 , 48-51 .

RUSSEL D.W. , GALSTON A.W. , 1967. - Flavonoid complexes in pisum sativum . IV - The effect of red light on synthesis of kaempferol complexes and on growth in subapical internode tissues . Phytochem. 6 , 791-797 .

RYBKINA G.V. , GUSEV N.A. , SEDYKI N.V. , BELKOVICH T.M. , VASKURIN V.A. , 1972. - [Une méthode de détermination de la teneur en eau des chloroplastes] . Fiziol. Biokhim. Kult. Rast. 4 , 322-325 .

SATÔ M. , 1966. - Metabolism of phenolic substances by the chloroplast . II - Conversion by the isolated chloroplast of p-coumaric acid to caffeic acid . Phytochem. 5 , 385-389 .

SATÔ M. , 1967. - Metabolism of phenolic substances by the chloroplast . III - Phenolase as an enzyme concerning the formation of esculetin . Phytochem. 6 , 1363-1373 .

SATÔ M. , 1969. - The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid . Phytochem. 8 , 353-362 .

SCHEELE , 1787. - Creello Annalen 1 - 3 - Cité par WEILL P. , DUCKERT R. 1945 Dans " Traité de Chimie organique " Vol. 11 , Fasc. 2 - p. 530 - Edit. GRIGNARD V. - Pub. MASSON .

SCHILL L. , GRISEBACH H. , 1973. - Properties of a phenolase preparation from cell suspension culture of parsley . Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 , 1555-1562 .

SCHNEIDER V. , 1973. - In vitro inhibition of photophosphorylation by kaempferol Z. Pflanzenphysiol. 70 , 88-93 .

SCHNEIDER V. , 1974. - Einfluss verschiedener Flavonole auf das Lamellarsystem der Chloroplasten in vitro . Z. Pflanzenphysiol. 72 , 36-51 .

SCHNEIDER M. , STIMSON W. , 1972. - Phytochrome and photosystem I interaction in high energy reponse . Proc. Nat.Acad.Sci. USA - 69 , 2150-2154.

SCHOTE J.B. , JONG H.J. de , DINGJAN H.A. , 1970. - Quantitative analysis on thin layers chromatograms experiments with a flying spot densitometer . Pharm. Weekblad - 105 , 1025-1046 .

SCHWEIGER A. , 1962. - Die Trennung einfacher Zucker auf Cellulosenschichten . J. Chromatog. 9 , 374-376 .

SMITH H. , HARPER D.B. , 1970. - The effects of short and long term irradiation on the flavonoids complement of the terminal bands of Pisum sativum var. Alaska . Phytochem. 9 , 477-485 .

SONDHEIMER E. , 1958. - On the distribution of caffeic and chlorogenic acid isomers in plants . Arch. Bioch. Bioph. 74 , 131-138 .

STAFFORD H.A. , 1969. - Changes in phenolic compounds and related enzymes in young plants of Sorghum . Phytochem. 8 , 743-752 .

STAFFORD H.A. , BALDY R. , 1970. - A monophenol oxydase activity in extracts of Sorghum. Plant Physiol. 45 , 215-222 .

STAFFORD H.A. , BLISS H. , 1973. - The effect of greening of Sorghum leaves on the molecular weight of a complex containing 4-hydroxycinnamic and hydroxylase activity . Plant Physiol. 52 , 453-458 .

STEVENS G. de , NORD F.F. , 1955. - Natural phenylpropane derivatives in " Modern Methoden Pflanzenanalyse " 392-427 - Edit. PEACH K. , TRACEY M. - Pub. SPRINGER .

STIEHL H.H. , WITT H.T. , 1968. - Die Kurtzeitigen ultravioletten Differenzspectren bei der Photosynthese . Z. Naturforschg. 23 B , 220-224 .

STIMSON W.R. , 1973. - Photosynthesis and phytochrome in the photocontrol of anthocyanin formation by Brassica rapa L. Diss. Abstr. 34 , 82 B .

STOCKING R.C. , 1959. - Chloroplast isolation in non aqueous media . Plant Physiol. 54 , 56-61 .

STRACK D. , REZNIK H. , 1972. - Die bei der Keimung von Cucurbita maxima Duchesne nachweisbaren Flavonoïden . Z. Pflanzenphysiol. 67 , 171-179 .

TAFURI F. , BUSINELLI M. , SCARPONI L. , 1972. - Effect of caffeic and p-coumaric acids on indole acetic acid metabolism . J. Sci. Food Agric. 23 , 1417-1423 .

TALUDKER M. Q-K , 1971. - A rapid quantitative thin-layer chromatographic separation of fucose from other neutral monosaccharides . J. Chromatog. 57 , 391-395 .

THOMAS V. , 1906. - Luteoline - In "Dictionnaire de Chimie" - 2ème Supp. - Vol. 6 - p. 263 - Edit. A. WURTZ .

THOMA J.A. , 1963. - A quantitative approach to unidimensional multiple chromatography . J. Chromatog. 12 , 441-452 .

TISSUT M. , 1969. - Etude de la répartition des flavonoïdes dans les différents tissus de la feuille de Hêtre . C.R. Acad. Sci. 268 , 65-68 .

TOLBERT N.E. , 1973. - Activation of polyphenol oxydase of chloroplasts . Plant Physiol. 51 , 234-244 .

TOMASZEWSKI M. , 1964. - The mechanism of synergistic effects between auxin and some natural phenolic substances . In " Regulateurs naturels de la croissance végétale " . p. 335-351 - Edit. CNRS .

TREBST A. , 1963 a. - The role of benzoquinones in the electron transport system . Proc. Roy. Soc. London Ser. B - 157 , 355-366 .

TREBST A. , 1971. - On the role of plastoquinone and on the nature of the primary acceptor of photosystem I in photosynthetic electron of chloroplasts . 399-417 , Rep. IIId Int. Congr. Photosynthesis Res. Juin 1971 - STRESA (Italie) .

TREBST A. , ECK H. , Untersuchungen uber die Beteiligung des Sauerstoffs in photosynthetischen Reaktionen mit Hilfe von Hemmstoffen . Z. Naturforschg. 16 B , [illegible] .

TREBST A. , WAGNER S. , 1962. - Über die Hydroxylation von Hydrochinonen und über eine latente Phenoloxydase in Chloroplasten . Z. Naturforsch 17 B , 396-400 .

TREBST A. , ECK H. , WAGNER S. , 1963. - Effects of quinones and oxygen in the electron transport system of chloroplasts . In " Photosynthetic Mechanism of green plants " 174-194 - N.A. Sc. USA - N.R.C. Washington .

TREBST A. , ECK H. , 1963. - Zur Rolle der Plastoquinone bei der Photosynthese. Z. Naturforschg. 18 B , 694-700 .

TRONCHET J. , 1966. - Les constituants flavoniques de Bryophyllum crenata . Ann. Sc. Univ. Besançon - 3 , 51-54 .

TRONCHET J. , 1968. - Essai de localisation des substances flavonoïdiques dans l'épaisseur des limbes de Bryophyllum crenatum aux divers stades du développement . C.R. Acad. Sci. 266 , 882-884 .

TRONCHET J. , 1971 a. - Localisation et répartition des dérivés flavoniques et des acides phénoliques dans les bulbes et les feuilles de variétés blanches d'Allium cepa (Lilliacée) . Ann. Sci. Univ. Besançon - 23-28 .

TRONCHET J. , 1971 b. - Les dérivés flavoniques des feuilles d'Allium porum L., localisation , répartition et effet des traumatismes . Bull. Soc. Bot. Fr. 118 , 173-184 .

TSUJIMOTO H.Y. , CHAIN R.K. , ARNON D.I. , 1973. - Photoreduction of NADP in the presence and in absence of ferredoxin-reducing substance (FRS) . Bioch. Bioph. Res. Comm. 51 , 917-923 .

ULLRICH W. , 1972. - Enzymatic hydroxylation with oxygen . Angew. Chem. Int. Edit. 11 , 701-712 .

VAN BRAGT J. , ROHRBAUGH L.M. , WENDER S.H. , 1965. - Identification of neochlorogenic acid in Tomato plants . Phytochem. 4 , 977-979 .

VAUGHAN P.F.T. , BUTT V.S. , GRISEBACH H. , SCHILL L. , 1969. - Hydroxylation of flavonoids by a phenolase preparation from leaves of Spinach beet . Phytochem. 8 , 1373-1378 .

VAUGHAN P.F.T. , BUTT V.S. , 1972. - The expression of catechol oxidase activity during the hydroxylation of p-coumaric acid by Spinach beet chloroplasts . Biochem. J. 127 , 641-647 .

VOLUNIETS A.P. , PROKHORCHIK R.A. , 1974. - [Combinaisons phénoliques des chloroplastes , du surnageant , des feuilles entières du Lupin jaune et du Lin à longue fibre]. Dokl. Akad. Nauk Bielorussk. SSSR - 18 , 263-266 .

WAGNER H. , 1964. - Infrared spectroscopy of flavonoids - 37-48 . In " Methods in polyphenol chemistry " Edit. PRIDHAM J.B. - Pub. Perg. Press - 146 p.

WAGNER H. , PATEL J. , HÖRHAMMER L. , YAP F. , REICHARDT A. , 1967. - Flavon-C-glykosides in den Blättern von Vitis cinerea D. Z. Naturforschg. 22 B , 988 .

WAGNER H. , HÖRHAMMER L. , KIRALY I.C. , 1970. - Flavon-C-glycoside in Croton zambesicus . Phytochem. 9 , 897 .

WAGNER H. , BUDWEG W. , IYENGAR M.A. , VOLK O. , SINN M. , 1972. - Linosid A und B , zwei neue Flavon-C-glykoside aus Linum maritimum . Z. Naturforschg. 27 B , 809-812 .

WALKER J.R.L. , THOMPSON J.E. , 1969. - Thin layer electrophoresis of phenolic compounds . Lab. Pract. 18 , 629 , 631 et 653 .

WARBURG O. , KRIPPAHL G. , GEWITZ H.S. , VÖLKER W. , 1959. - Uber den chemischen Mechanismus der Photosynthese . Z. Naturforschg. 14 B , 712-724 .

WARDALE D.A. , 1973. - Effect of phenolic compounds in Lycopersicum esculentum on the synthesis of ethylene . Phytochem. 12 , 1523-1530 .

WATTIEZ N. , STERNON F. , 1942. - Signification biologique des hétérosides . In " Eléments de chimie végétale " 467-469 - 2ème édition - Edit. MASSON .

WEBER P. , 1963. - Über gelöstes lamellares Strukturproteides aus Chloroplasten von Antirrhinum majus . Z. Naturforschg. 18 B , 1106-1110 .

WEISSENBOCK G. , 1973. - Untersuchungen zur Lokalisation von Flavonoïden in Plastiden - II - Vergleich des Flavonoïdenmunster isolierter Etioplasten und Chloroplasten von Avena sativa L. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86 , 351-364 .

WEISSENBOCK G. , SCHNELDER V., 1974 - Untersuchungen zur Lokalisation von Flavonoïden in Plastiden III das Problem der Kontamination isolierter Plastiden durch Flavonoïde . Z. Pflanzenphysiol. 72 ,23-35

WEISSENBOCK G. , TEVINI M. , REZNICK H. , 1971. - Uber das Vorkommen von Flavonoïden in Chloroplasten von Impatiens balsamina . Z. Pflanzenphysiol. 64 , 274-277 .

WEISSENBOCK G. , FLEING I. , RUPPEL H.G. , 1972. - Untersuchugen zur Lokalisation von Flavonoïden in Plastiden - I - Flavonoïde in Etioplasten von Avena sativa L. . Z. Naturforschg. 27 B , 1216-1224 .

WEST J. , 1973. - Anomalous effects of Phlorrhizin (Phloridzin) on Photosynthetic oxygen production . Biochem. Soc. Trans. 888-890 .

WILDNER G.F. , ZILG H. , CRIDDLE R.S. , 1971. - Light effect on isolated ribulose diphosphate carboxylase activity . Proc. IId Int. Cong. Photosynthesis Res. 2 , 1825-1829 .

WITT H.T. , 1971. - Coupling of quanta , electrons , fields ions and phosphorylations in the functional membrane of photosynthesis . Quart. Rev. Biophysics - 4 , 365-477 .

WONG E. , WILSON T.M. , 1972 a. - The oxidation of chalcones catalysed by peroxydase . Phytochem. 11 , 875 .

WONG E. , WILSON T.M. , 1972 b. - The oxidation of chalcones by peroxydase . Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 , 132 .

WORTHINGTON , 1972. - Enzymes , enzymes reagent and related biochemicals . p. 39 - Polyphenoloxydase - Pub. WORTHINGTON Biochem. Corp - New-Jersey - 216 p.

WOSILAIT W.D. , NASON A. , TERREL A.J. , 1954. - Pyridine nucleotide quinone reductase - II - Role in electron transport . J. Biol. Chem. 206 , 271-282 .

YOCUM C.F. , SAN PIETRO A. , 1970. - Ferredoxin-reducing substance (FRS) from Spinach - III - Separation and assay . Arch. Bioch. Bioph. 140 , 152-157 .

YOUNG M.R. , NEISH A.C. , 1966. - Properties of the ammonialyases deaminating phenylalanine and related compounds in Triticum aestivum and Pteridium aquilinum . Phytochem. 5 , 1121-1132 .

YOUNG M.R. , TOWERS G.H.N. , NEISH A.C. , 1966. - Taxonomic distribution of ammonialyase for L-phenylalanine and L-tyrosine in relation to lignification . Can. J. Bot. 44 , 341-349 .

ZAPROMETOV M.N. , KOLONKOVA S.V. , 1967. - [Sur la biosynthèse de composés phénoliques dans les chloroplastes] . Dokl. Akad. Nauk SSSR - 176 , 470-473 .

ZBORIL P. , DADAK V. , 1973. - Hydrophobic interaction of isoprenic coumarin ostruthin with nonphosphorylating mitochondrial fragments . Arch. Bioch. Bioph. 159 , 249-258 .

ZOLL A. , 1972. - Sur une Caryophyllacée médecinale , Spergularia rubra L. . J et C. PRESL - Thèse Doctorat Pharmacie - Grenoble - 196 p.

ZOLL A. , NOUVEL G. , 1974 - Etude comparative des C-glycosylflavones de deux Caryophyllacées :Spergularia rubra L. J et C. PRESL et Stellaria hollostea L. - Plantes Med. Phytoter. 8 , 134-140 .

ZUCKER M. , 1965. - Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue . Plant Physiol. 5 , 779-789 .

ZUCKER M. , 1972. - Light and enzymes . Ann. Rev. Plant Physiol. 23 , 133-156 .